

**Isolierung und Charakterisierung der cDNAs für die
Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa der Forelle
und Evolution von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten**

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt**

**von
Stefan Exner
aus Kassel**

Marburg an der Lahn 1997

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Mai 1995 bis April 1997 im Arbeitskreis von Prof.Dr. Kadenbach am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 9.April 1996 angenommen.

Erstgutachter	Prof.Dr. Kadenbach
Zweitgutachter	Prof.Dr. Marahiel

Tag der mündlichen Prüfung am 7.Mai 1997

1 EINLEITUNG	5
1.1 Zellatmung	5
1.2 Die Atmungskette	5
1.3 Thermogenese	6
1.4 Die Cytochrom-c-Oxidase	6
1.4.1 Funktion der Cytochrom-c-Oxidase	7
1.4.2 Struktur der Cytochrom-c-Oxidase	7
1.4.3 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase	8
1.4.4 Isoformen von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten	9
1.5 Cytochrom-c-Oxidase und Thermogenese	11
1.6 Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa	12
1.7 Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va	12
2 ZIELSETZUNG	13
3 AUSGEWÄHLTE THEORETISCHE GRUNDLAGEN	14
3.1 Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE)	14
3.2 'Touch-Down'- PCR	17
3.3 Klonierungsvektoren	17
3.4 DNA-Quantitierung mit PCR	19
4 ABKÜRZUNGEN	21
5 MATERIALLISTE	23
5.1 Geräte	23
5.2 Kits, Marker	24
5.3 Bakterienstämme, Vektoren	24
5.3.1 Bakterienstamm	24
5.3.2 Vektoren	25
5.4 Primer	25
5.5 Enzyme und zugehörige Puffer	26
5.6 Modifizierende Enzyme	26
5.7 Restriktionsenzyme	26

5.8 Substanzen für Nährmedien	26
5.9 Antibiotika	27
5.10 Reagentien für die Elektrophorese	27
5.11 Radioaktives Material	27
5.12 Chemikalien	28
5.13 Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen	29
5.13.1 Medien	29
5.13.2 Puffer	30
5.13.3 Lösungen	34
5.14 Tiere	36
6 METHODEN	37
6.1 Sicherheitsbestimmungen	37
6.2 Allgemeine Bemerkungen	37
6.3 Standardmethoden	38
6.3.1 Gießen von Agarplatten	38
6.3.2 Gewinnung einzelner Bakterienkolonien	38
6.3.3 Anlegen von Übernachtskulturen	38
6.3.4 Anlegen von Glycerinkulturen	39
6.3.5 Photometrische Quantitierung von DNA	39
6.3.6 Fällern und Waschen von DNA	39
6.3.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
6.3.8 Agarosegelelektrophorese	40
6.3.8.1.1 Agarosegelelektrophorese von DNA	40
6.3.8.1.2 Agarosegelelektrophorese mit 'Syber-green I'-Fluoreszenzfarbstoff	41
6.3.8.2 Agarosegelelektrophorese von RNA	41
6.3.9 Quantitierung von DNA durch Agarosegelelektrophorese	41
6.3.10 Vorbehandlung der synthetischen Primer	42
6.3.11 Siliconisieren von Glasgeräten	42
6.3.12 Sequenzgele	43
6.3.12.1 Hochspannungspolyacrylamidgelelektrophorese	43
6.3.12.2 Salzgradientensequenzgelelektrophorese	44
6.3.13 Autoradiographien	44
6.4 RNA-Präparationen	44
6.4.1 Allgemeine Maßnahmen beim Umgang mit RNA	45
6.4.2 Präparation von gesamt RNA	45
6.4.3 Präparation von mRNA	46
6.5 Polymerasekettenreaktion ('PCR)	46
6.5.1 Standard PCR	46
6.5.2 Touch Down PCR	47
6.6 Abtrennung von Primern und Nukleotiden aus PCR Ansätzen	47

6.6.1 Reinigung von PCR Produkten mit Qiagen-Quick-Spin-Säulen	48
6.6.2 Reinigung von PCR Produkten mit amiconfiltern™	48
6.7 Reverse Transkription	48
6.8 Polyadenylierung von DNA	49
6.9 Elution von DNA aus Agarosegelen	50
6.9.1 'Jet-Sorb'-Elution von DNA	50
6.9.2 'Nucleotrap'-Elution von DNA	50
6.10 Subklonierung	51
6.10.1 Herstellen von kompetenten Zellen	51
6.10.2 Vorbehandlung von Vektor und Insert	51
6.10.2.1 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden	51
6.10.2.1.1 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden mit Vent-Polymerase	52
6.10.2.1.2 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden mit Klenow-Polymerase	52
6.10.2.2 Dephosphorylieren von DNA	52
6.10.2.3 Phosphorylieren von DNA	52
6.11 Ligation	53
6.11.1 Standardligation	53
6.11.2 Transformation	54
6.12 DNA Präparationen	54
6.12.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA	55
6.12.2 Präparation mit dem 'Qiagen Plasmid Kit'	55
6.12.3 TENS-Plasmidpräparation	55
6.13 DNA Sequenzierung	56
6.13.1 Denaturierung Doppelsträngiger DNA	56
6.13.2 Sequenzreaktion	56
6.13.3 Sequenzanalysen	58
6.13.3.1 RNA-Sekundärstrukturberechnungen	58
6.13.3.2 Phylogenetische Rechnungen	59
7 ERGEBNISSE	60
7.1 Isolierung und Charakterisierung der cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forelle	60
7.1.1 Isolierung und Charakterisierung von 3'cDNA-Enden für die Untereinheit VIa	60
7.1.1.1 Amplifikation von 3'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa durch 3'RACE	60
7.1.1.2 Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen mit 3'Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa	63
7.1.2 Isolierung und Charakterisierung von 5'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forellenleber	67
7.1.2.1 Amplifikation von cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa in 5'Richtung	67
7.1.2.2 Isolierung und Charakterisierung von 5'RACE-Klonen der Untereinheit VIa	69

7.1.2.3 Verlängerung von 5'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa durch eine Reverse Transkriptasereaktion mit zwei Denaturierungsschritten	74
7.1.2.4 Isolierung und Charakterisierung eines Klons mit dem 5'cDNA-Ende der Untereinheit VIa	75
7.1.3 Analyse der cDNA Sequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forelle	78
7.1.3.1 Sequenzvergleiche mit homologen Sequenzen der Untereinheit VIa	78
7.1.3.2 Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa	80
7.1.3.3 Mögliche mRNA Sekundärstrukturen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa	81
7.2 Isolierung und Charakterisierung einer cDNA-Sequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va aus Forelle	85
7.2.1 Isolierung und Charakterisierung des 3'cDNA-Endes für die Untereinheit Va	85
7.2.1.1 Amplifikation von 3'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va durch 3'RACE	85
7.2.1.2 Isolierung und Charakterisierung eines Klons mit dem 3'cDNA-Ende der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va	87
7.2.1.3 Amplifikation von cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va in 5'Richtung	89
7.2.1.4 Isolierung und Charakterisierung von 5'RACE Klonen der Untereinheit Va	90
7.3 Bestimmung der Mengenverhältnisse von Transkripten der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa in verschiedenen Forellenorganen	94
7.3.1 Quantitierungsansatz	94
7.3.2 Quantitative Amplifikationen von mRNA-Sequenzen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa aus verschiedenen Organen	95
7.3.3 Häufigkeiten von cDNA Transkripten für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa	97
8 DISKUSSION	100
8.1 Diskussion der Methoden	100
8.2 Diskussion der Ergebnisse	104
9 ZUSAMMENFASSUNG	109
10 LITERATUR	110

1 Einleitung

1.1 Zellatmung

In Zellen wird die Energie aus der Nahrung oder aus gespeicherten Fettreserven in Form des universellen Energieüberträgers ATP verfügbar gemacht. Dies geschieht in spezialisierten Zellorganellen, den Mitochondrien.

Hier werden zunächst über den Citratcyclus Stoffwechselprodukte zu Kohlendioxid abgebaut, wobei chemisch gebundener Wasserstoff in Form der Reduktionsäquivalente NADH oder FADH_2 entsteht. Dieser Wasserstoff wird dann in einer Atmungskette aus vier Enzymkomplexen mit Sauerstoff zu Wasser "verbrannt". Die dabei freiwerdende Energie dient zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran. Das Potential des Protonengradienten kann dann zur Bildung des Energieträgers ATP genutzt werden (Mitchell 1966).

1.2 Die Atmungskette

Die Atmungskette besteht aus vier Enzymkomplexen, die in der Mitochondrieninnenmembran lokalisiert sind.

Der Komplex I, die NADH-Dehydrogenase (NADH-Ubichinon-Reduktase) überträgt den in Form von NADH gebundenen Wasserstoff auf Ubichinon. Analog überträgt der FAD-haltige Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) Wasserstoff aus Succinat auf Ubichinon. Der Komplex III (Ubihydrochinon-Cytochrom-c-Reduktase; bc_1 -Komplex) reoxidiert das entstandene Ubihydrochinon wieder zu Ubichinon und reduziert dabei das lösliche Cytochrom c, welches vom Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase)

reoxidiert wird. Die Cytochrom-c-Oxidase überträgt schließlich die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wobei Wasser gebildet wird.

Die Komplexe I, III und IV wirken während der Elektronenübertragung auch als Protonenpumpen, die Protonen aus den Mitochondrien hinausbefördern und so ein elektrochemisches Potential aufbauen. Die ATP-Synthese aus ADP und anorganischem Posphat erfolgt dann unter Nutzung des Protonengradienten durch den Komplex V (ATP-Synthase; F_0F_1 -ATPase), der ebenfalls in der Mitochondrieninnenmembran lokalisiert ist (von Jagow Engel 1980).

1.3 Thermogenese

Die über die Atmungskette verfügbar gemachte Energie dient bei höheren Organismen unter anderem zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur.

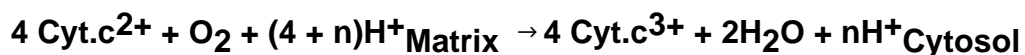
Es wurde gezeigt, daß warmblütige Tiere einen höheren Energieumsatz haben als Kaltblütige (Bennett et al. 1981). Untersuchungen von Heldmaier (Heldmaier et al. 1989) am djungarischen Hamster konnten einen erhöhten Sauerstoff- -und somit einen erhöhten Energieverbrauch- bei niedrigen Temperaturen in vielen Organen nachweisen.

Ein spezieller Mechanismus für diese Wärmeerzeugung wurde bisher nur im braunen Fettgewebe von Kleinsäugetieren gefunden, wo ein Entkopplerprotein den Protonengradienten an der Mitochondrieninnenmembran abbauen kann und somit die darin gespeicherte Energie zur Wärmeerzeugung verbraucht (Klingenberg 1990). Ansonsten sind die molekularen Mechanismen der Wärmeregulation noch unbekannt. Es konnten aber bereits zahlreiche regulatorische Einflüsse auf die Atmungskette gefunden werden (siehe 1.5).

1.4 Die Cytochrom-c-Oxidase

1.4.1 Funktion der Cytochrom-c-Oxidase

Die Cytochrom-c-Oxidase ist ein in die innere Mitochondrienmembran eingebundener Transmembrankomplex. Sie katalysiert bei allen Eukaryonten (Wikström et al. 1981, Kadenbach et al. 1983) und bei einigen fakultativ aeroben Prokaryonten (Hon-nami, Haltia et al. 1988; Saraste et al. 1991; Chepuri et al. 1990) den terminalen Schritt der Elektronenübertragung in der Atmungskette, die Oxidation von molekularem Sauerstoff unter Bildung von Wasser:



Durch den Protonenverbrauch bei dieser Reaktion in der Matrix und durch die Protonenpumpaktivität trägt die Cytochrom-c-Oxidase zum Aufbau des Protonengradienten über die Mitochondrieninnenmembran bei (Wikström, Saari 1977; Wikström 1984; Siegel, Carafoli 1980).

Die H^+/e^- -Stöchiometrie der Protonenpumpe wurde mit eins angegeben (Wikström 1984), ist aber offenbar variabel (Kadenbach 1995 et al.; Papa et al. 1987; Steverding et al. 1993; Frank, Kadenbach 1996).

1.4.2 Struktur der Cytochrom-c-Oxidase

Kristallstrukturen der Cytochrom-c-Oxidase sind mit einer Auflösung von 2.8 Å aus *Paracoccus Denitrificans* (Iwata et al. 1995) und Rinderherz bekannt (Tsukihara et al. 1995 und 1996).

In der Kristallstruktur der Cytochrom-c-Oxidase von *Pracoccus Denitrificans*, welche aus vier Untereinheiten besteht, wurden zwei Protonenkanäle gefunden, von denen

einer für die Wasserbildung und der andere für die Protonentranslokation dient (Iwata 1995).

Die Rinderherz Cytochrom-c-Oxidase wurde als Dimer kristallisiert. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten wurde der Aufbau dieses Enzyms aus 13 Untereinheiten (Capaldi 1990; Kadenbach et al. 1983), von denen die Untereinheiten I und II die katalytische Funktion vermitteln (Saraste et al. 1990; Thomas et al. 1994) bestätigt (Tsukihara et al. 1995 und 1996).

Das zweikernige Kupferzentrum CuCu_A , auf welches Elektronen vom Cytochrom-c übertragen werden, hat die Struktur des $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ -Typs der Eisen-Schwefel-Proteine, wobei die Schwefelatome des Metheonins als Liganden dienen. Es ist mit der Untereinheit II assoziiert. Die Untereinheit I bindet die ebenfalls am Elektronenfluß beteiligten Redoxzentren Häm a und das zweikernige Cu_A -Häm a_3 -Zentrum, welches die Sauerstoffbindungsstelle bildet. Die beiden Häm-Gruppen sind nicht kovalent gebunden und stehen senkrecht zur Membranebene in einem Winkel von 104° zueinander. Zwischen den Untereinheiten I und II befindet sich ein Magnesiumatom, das Cu_A stabilisiert (Tsukihara et al. 1995).

In der Untereinheit I wurden zwei mögliche Protonenkanäle für die Protonenpumaktivität postuliert sowie einer für die zur Wasserbildung nötigen Protonen, und ein Kanal zwischen Untereinheit I und II für das Reaktionswasser (Tsukihara et al. 1996).

1.4.3 Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase

Die Cytochrom-c-Oxidase besteht aus mehreren Polypeptiduntereinheiten, die alle im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 vorkommen (Kuhn-Nentwig, Kadenbach 1987; Kadenbach et al. 1983).

Bei Prokaryonten fand man bisher zwei (Hon-nami et al. 1984; Yamamaka et al. 1980) bzw. drei (Saraste et al. 1986; Bolgiano et al. 1988; Haltia et al. 1992; Kai et

al. 1992) Untereinheiten. Nur bei *Paracoccus denitrificans* ist ein viertes assoziiertes Polypeptid bekannt (Haltia 1992).

Die eukaryontische Cytochrom-c-Oxidase besteht aus den drei großen, vom Mitochondriengenom codierten Untereinheiten I, II und III, die homolog zu den prokaryontischen Untereinheiten sind, sowie einer unterschiedlichen Anzahl von kleineren kerncodierten Untereinheiten (Kadenbach et al. 1987).

Die Anzahl der kerncodierten Untereinheiten variiert von Spezies zu Spezies. So wurden bei *Dictyostelium discoideum* insgesamt sieben Untereinheiten gefunden, (Bisson, Schiavo 1986) ebenso wie in der Süßkartoffel (Nakagawa et al. 1987) und in Haien (Wilson et al. 1980) sowie neun Untereinheiten beim Ochsenfrosch (Goto et al. 1982). Diese Zahlen wurden allerdings mit Trennsystemen ermittelt, die noch nicht in der Lage waren Cytochrom-c-Oxidase aus Rinderherz in die heute bekannte Anzahl von Untereinheiten aufzuspalten und sind daher kritisch zu betrachten. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind elf Untereinheiten bekannt (Geier et al. 1995). Bei der Regenbogenforelle wurden bisher elf Untereinheiten gefunden (Freund, Kadenbach 1994). Bei Säugetieren gelten dreizehn Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten als gesichert (Capaldi 1990; Kadenbach et al. 1987; Tsukihara et al. 1996).

Die kleinen kerncodierten Untereinheiten werden im Cytosol hergestellt, von dort aus in die Mitochondrien transportiert und beim Zusammenbau der Cytochrom-c-Oxidase in deren Innenmembran eingebaut. Zur Zielsteuerung der kerncodierten Untereinheiten werden die meisten von ihnen mit N-terminalen Signalsequenzen synthetisiert (Schatz, Butow 1979; Hay et al. 1984; Hurt et al. 1984), die nach dem Einbau in die Mitochondrien von einer Signalpeptidase abgespalten werden, welche im Innern der Mitochondrien (Matrixseite der Mitochondrieninnenmembran) lokalisiert ist. Die Untereinheit VIc aus Rattenleber ist eine Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit, die ohne spaltbare Präsequenz hergestellt wird (Schneyder et al. 1991). Ihre Zielsteuerung wird durch einen basisch, hydrophoben N-terminalen Bereich gewährleistet (Suske et al. 1987).

1.4.4 Isoformen von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten

Die Funktion der kerncodierten Untereinheiten ist noch weitgehend ungeklärt. Es wurde angenommen, daß diese Untereinheiten am Zusammenbau des Cytochrom-c-Oxidase Komplexes beteiligt sind (Dowhan et al. 1985).

Für wenige Untereinheiten konnte inzwischen nachgewiesen werden, daß diese die Regulation der Cytochrom-c-Oxidase vermitteln. So wurde vor Kurzem die Regulation über eine allosterische Nukleotidbindungsstelle an der Untereinheit IV des Rinderherzenzyms gezeigt (Napiwotzki et al. 1997). An der Untereinheit VIa des Rinderherzenzyms wurde eine ATP-Bindungsstelle im N-terminalen, zur Matrix hin orientierten Bereich gefunden (Anthony et al. 1993), welche durch die Kristallstruktur bestätigt wurde (Tsukihara et al. 1996). Am isolierten Rinderherzenzym wurde gezeigt, daß ein Austausch von ADP gegen ATP an dieser Bindungsstelle die H^+/e^- Stöchiometrie um die Hälfte vermindert. Dieser Effekt trat beim Rinderleberenzym nicht auf (Frank & Kadenbach 1996).

Das Vorkommen von kerncodierten Untereinheiten in organspezifischen Isoformen ist ein weiterer Hinweis auf eine Bedeutung dieser Untereinheiten für regulierende Einflüsse auf die Cytochrom-c-Oxidase. Solche Isoformen konnten durch Auftrennung per SDS-PAGE aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte identifiziert werden (Merle, Kadenbach 1980, Freund, Kadenbach 1994). Die Isoformen eines Organismus zeigen untereinander größere phylogenetische Entfernungen als zwischen demselben Gewebstyp einer Untereinheit aus verschiedenen Spezies zu finden sind (Saccone et al. 1991). Tabelle 1 gibt einen Überblick über Isoformen von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten, die aufgrund ihrer cDNA-Sequenz bekannt sind.

Tabelle 1: Isoformen bekannter cDNAs von kerncodierten Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten aus Säugetieren

Unter-einheit	Spezies	Isoenzymentypen	Referenz
VIa	Rind	Herz, Leber	Smith et al.1991; Ewart et al.1991
	Ratte	Herz, Leber	Mell et al. 1994
	Mensch	Herz, Leber	Fabrizi et al. 1992; Fabrizi et al.1989
VIIa	Rind	Herz, Leber	Seelan, Grossman 1991; Seelan et al.1989
	Ratte	Leber	Enders et al. 1990
	Mensch	Herz, Leber	Arnaudo et al. 1992
VIII	Rind	Herz, Leber	Lightowlers et al. 1990
	Ratte	Herz, Leber	Scheja, Kadenbach 1992; Winter 1991
	Mensch	Leber	Rizzuto et al. 1989

1.5 Cytochrom-c-Oxidase und Thermogenese

Die gewebsspezifische Regulation der H^+/e^- -Stöchiometrie der Cytochrom-c-Oxidase, die für den Herzmuskel nachgewiesen wurde, legt die Vermutung nahe, daß dieser Effekt eine Bedeutung für die Wärmeerzeugung bei geringer Muskelaktivität, wie zum Beispiel im Schlaf, hat (Frank & Kadenbach 1996). Dies wird durch den Befund gestützt, daß im Rinderfötus, der in einem anderen Temperaturmilieu existiert, verstärkt mRNA-Anteile der Untereinheit VIa Leberform in Herz- und Skelettmuskelgewebe gefunden wurden, in denen kurz vor der Geburt die Transkription der Herzform verstärkt wird (Ewart et al. 1991). Das gleiche Phänomen wurde beim Menschen für die Untereinheit VIa in Herz und Skelettmuskel beschrieben (Bonne et al. 1993).

Da vollständige Sequenzen der kerncodierten Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten von Fischen und anderen kaltblütigen Tieren noch unbekannt waren, konnte bisher

ein Vergleich von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten zwischen kaltblütigen Tieren untereinander als auch zwischen warm- und kaltblütigen Tieren noch nicht erfolgen. Durch derartige Vergleiche könnte nachgewiesen werden, ob sich evolutionäre Anpassungen, wie Warm- und Kaltblütigkeit, auf molekularer Ebene in der Struktur der Cytochrom-c-Oxidase widerspiegeln. Dies würde zur Aufklärung der Funktion der Cytochrom-c-Oxidase für die Thermogenese beitragen.

1.6 Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

cDNA-Sequenzen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa sind aus Hefe (Taanman, Capaldi 1992) und einigen Säugetierspezies (Schlerf et al. 1988; Smith et al. 1991; Ewart et al. 1991; Mell et al. 1994; Fabrizi et al. 1989) bekannt. Bei der Charakterisierung von Cytochrom-c-Oxidase Präparationen aus Forellen wurde die Untereinheit VIa nicht gefunden (Freund & Kadenbach 1994).

In der Kristallstruktur des Rinderherzenzyms findet sich diese Untereinheit zwischen den beiden Monomeren des Cytochrom-c-Oxidasedimers. Sie hat einen zur Matrix hin orientierten N-Terminus und eine transmembrane Domäne (Tsukihara 1996).

Neben dem Vorkommen der Untereinheit VIa in verschiedenen Isoformen bei Säugetieren gibt es Hinweise für eine regulierende Funktion dieser Untereinheit. So wurden beim Hefeenzym nach Ablösung der Untereinheit VIa veränderte Aktivitäten und veränderte ATP Einflüsse auf das Enzym gefunden (Taanman et al. 1993 und 1994). Beim Rind vermittelt diese Untereinheit eine gewebsspezifische Regulation der H^+/e^- -Stöchiometrie des Enzyms (Frank & Kadenbach 1996). Für die Untereinheit VIa Herzform in Muskelzellen findet beim Rind und beim Menschen kurz vor der Geburt ein Expressionswechsel statt, bei dem verstärkt Herztyp mRNA der Untereinheit VIa transkribiert wird. (Ewart et al. 1991; Bonne et al. 1993).

1.7 Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

cDNA Sequenzen dieser Untereinheit sind aus Hefe (Wright et al. 1984) und aus den Säugetieren Rind (Tanaka et al. 1979), Maus (Nielsen et al. 1989), Ratte (Droste et al. 1989) und Mensch (Rizzuto et al. 1988) bekannt. Sie ist in Säugetieren offenbar hochkonserviert.

Die Untereinheit Va hat keine transmembrane Domäne und liegt auf der Matrixseite des Enzyms (Tsukihara 1996).

2 Zielsetzung

Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa wurde bisher bei der Forelle nicht nachgewiesen (Freund et al. 1994). Aufgrund der Identifizierung der Untereinheit VIa in der Cytochrom-c-Oxidase aus Karpfenherz durch Susanne Arnold sollte geprüft werden, ob sich diese Untereinheit nicht doch in der Forelle nachweisen lässt, die dem Karpfen sehr verwandt ist.

Für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa wurde eine zentrale Rolle für die Thermogenese postuliert (Frank, Kadenbach 1996). Cytochrom-c-Oxidasegene aus kaltblütigen Tieren waren bisher nicht charakterisiert. Über die Isolierung und Charakterisierung der Forellen cDNA sollte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen den Sequenzen der kaltblütigen Forelle und der warmblütigen Säugetiere eine funktionelle Bedeutung der Untereinheit VIa für die Thermogenese bestätigen.

1 Zielsetzung

Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa wurde bisher bei der Forelle nicht nachgewiesen (Freund et al. 1994). Aufgrund der Identifizierung der Untereinheit VIa in der Cytochrom-c-Oxidase aus Karpfenherz durch Susanne Arnold sollte geprüft werden, ob sich diese Untereinheit nicht doch in der Forelle nachweisen lässt, die dem Karpfen sehr verwandt ist.

Für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa wurde eine zentrale Rolle für die Thermogenese postuliert (Frank, Kadenbach 1996). Cytochrom-c-Oxidasegene aus kaltblütigen Tieren waren bisher nicht charakterisiert. Über die Isolierung und Charakterisierung der Forellen cDNA sollte untersucht werden, ob Unterschiede zwischen den Sequenzen der kaltblütigen Forelle und der warmblütigen Säugetiere eine funktionelle Bedeutung der Untereinheit VIa für die Thermogenese bestätigen.

3 Ausgewählte theoretische Grundlagen

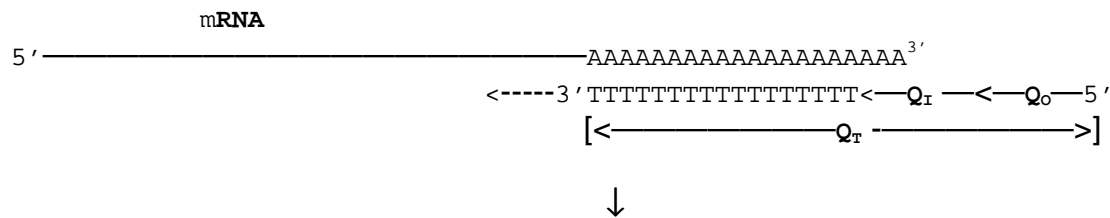
3.1 Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE)

Zur Isolierung von cDNAs für Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase wurde eine neue PCR-Methode von Frohmann (1995) gewählt, die in Abbildung 1 und 2 schematisch dargestellt ist.

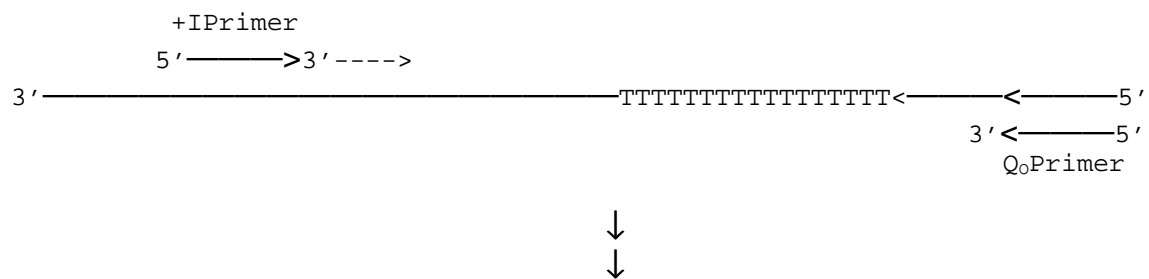
Zur Amplifikation von 3'-cDNA-Enden wird dabei zunächst mit einem Poly-T-Primer aus RNA mit Reverser Transkriptase ein cDNA-Erststrang hergestellt. Dieser $Q_0Q_1dT_{17}$ -Primer enthält neben einem 17 b Poly-T-Ende an seinem 5'-Ende eine GC reiche Sequenz, die zwei hintereinanderliegenden Primersequenzen (Q_1 und Q_0) entspricht. Mit einem Primerpaar aus dem Q_0 -Primer, der eine 5'-terminale Teilsequenz des $Q_0Q_1dT_{17}$ -Primers darstellt, und einem genspezifischen Primer werden dann in einer PCR cDNA-Enden amplifiziert. Dabei ermöglicht es die GC reiche Sequenz des Q_0 -Primers PCRs mit hohen, stringenten Annealingtemperaturen durchzuführen. Die Q_1 -Primersequenz, die zwischen der Poly-T- und der Q_0 -Sequenz des Q_1 -Primers liegt, ermöglicht in Kombination mit einem zweiten genspezifischen Primer eine weitere ('nested') PCR mit inneren Primern aus den vorherigen PCR-Produkten. Dadurch werden viele unspezifische Fragmente, die in der ersten PCR amplifiziert werden können nicht weiter vervielfältigt.

Für die Amplifikation von 5'-cDNA-Enden muß ein geeignetes Template hergestellt werden, auf das dieselbe Vorgehensweise angewendet werden kann. Dazu wird mit einem genspezifischen Primer, der komplementär zur mRNA ist, der cDNA-Erststrang mit Reverser Transkriptase hergestellt. Wird an diesen cDNA-Erststrang ein Poly-A-Schwanz mit Terminaler Nukleotidtransferase und dATP angehängt, so kann der cDNA-Zweitstrang mit dem Q_1 -Primer und DNA-Polymerase erzeugt werden. Aus diesem cDNA-Zweitstrang lassen sich ebenso wie bei der 3'RACE mit Kombinationen von genspezifischen Primern und den Primern Q_1 bzw. Q_0 5'-cDNA-Enden vervielfältigen.

A



B



C

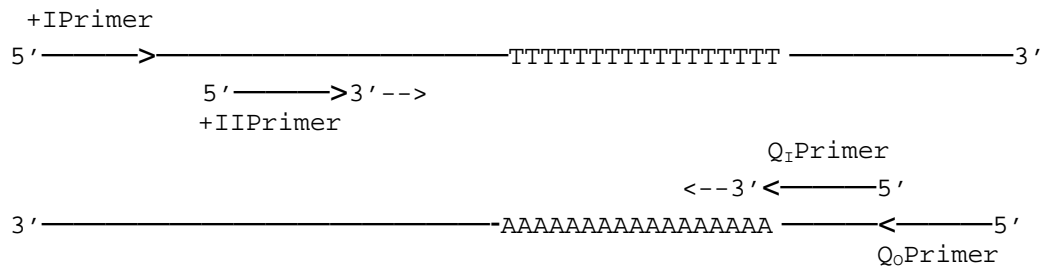
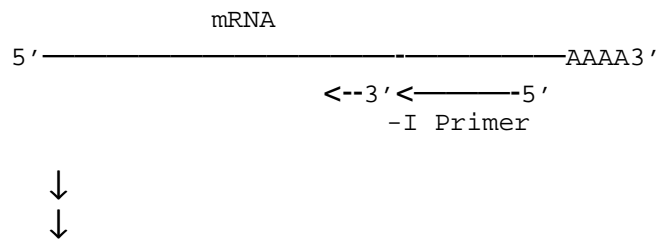


Abbildung 1 3'-RACE

A) Mit dem Poly-A-mRNA-Ende hybridisiert der Q_OQ_IdT₁₇-Primer (Q_T), dessen 5'-Ende die Primersequenzen Q_I und Q_O enthält. Von diesem Primer aus wird mit Reverser Transkriptase der cDNA-Erststrang hergestellt. B) Aus dem cDNA-Erststrang wird mit dem Q_O-Primer und einem genspezifischen Primer ein doppelsträngiges cDNA-Fragment in einer PCR vervielfältigt. C) Aus diesem cDNA-Fragment erfolgt eine zweite ('nested') PCR mit dem inneren genspezifischen +II-Primer und dem inneren Q_I-Primer.

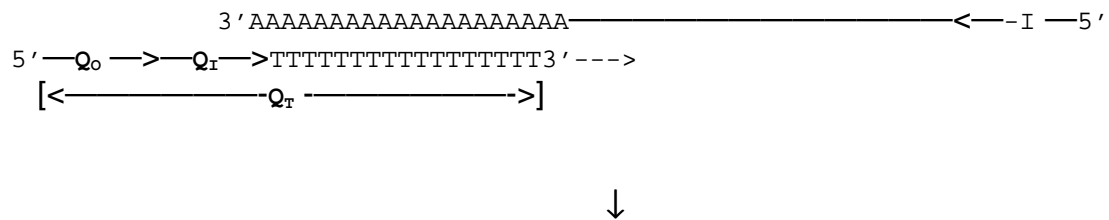
A



B



C



D

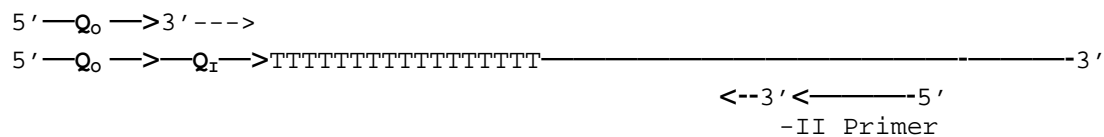


Abbildung 2 5'-RACE

A) Mit einem genspezifischen Primer (-I) wird aus mRNA mit Reverser Transkriptase ein cDNA-Erststrang hergestellt. B) Der cDNA-Erststrang wird mit dATP und Terminaler Nukleotidtransferase polydadenyliert. C) Mit dem angehängten Poly-A-Ende des cDNA Erststranges hybridisiert der Q_T-Primer, dessen 5'-Ende die Primersequenzen Q_I und Q_O enthält. Vom Q_T-Primer aus wird der cDNA-Zweitstrang hergestellt. D) Aus dem cDNA-Zweitstrang wird mit dem genspezifischen inneren -II Primer und dem Q_O-Primer ein cDNA-Fragment vervielfältigt. Wie bei der 3'-RACE kann aus diesem Fragment mit dem inneren Q_I-Primer und einem weiteren, inneren genspezifischen Primer eine zweite ('nested') PCR durchgeführt werden.

3.2 'Touch-Down'- PCR

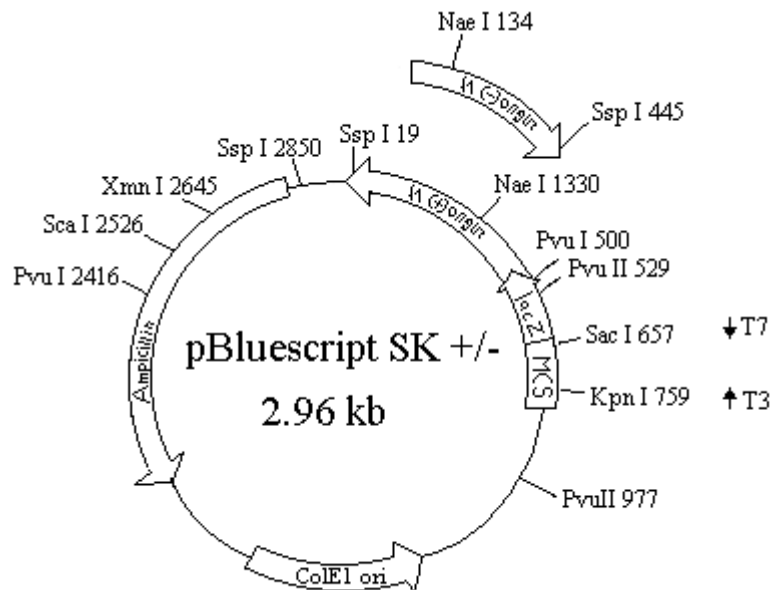
Diese Methode ermöglicht sehr spezifische Amplifikationen auch wenn die Annealingtemperatur, wie z.B. bei Primergemischen, nur schlecht abgeschätzt werden kann oder zwei Primer mit sehr unterschiedlichen Annealingtemperaturen eingesetzt werden.

Bei dieser Methode erfolgt in den ersten Zyklen die schrittweise Absenkung einer hohen Anfangsannealingtemperatur. Während dieser Absenkung wird ab einer bestimmten Zyklenzahl eine Temperatur erreicht, an der ein eingesetzter Primer gut und spezifisch hybridisiert. In dieser Anfangsphase werden daher unter stringenten Bedingungen DNA-Templates vervielfältigt. Dadurch erniedrigt sich die Konzentration der Fremd-DNA soweit, daß in den späteren Zyklen auch bei unstringenten Annealingtemperaturen spezifische Fragmente amplifiziert werden.

3.3 Klonierungsvektoren

Für Subklonierungen von DNA-Fragmenten wurden pBlueskript™- oder PUC18™-Plasmidvektoren verwendet. Diese Plasmide haben mehrere für die Klonierung wichtige Eigenschaften:

- Ein Ampicillinresistenzgen ermöglicht die Selektion, der mit dem Vektor transformierten Zellen
- Die 'Multiple Cloning Site' (MCS) erleichtert mit vielen Restriktionsschnittstellen den Einbau von DNA Fragmenten
- Die 'Multiple Cloning Site' liegt innerhalb des β -Galactosidasegens (LacZ), welches mit X-Gal (bei Anwesenheit von IPTG) einen Farbnachweis (siehe Abb.3, Abb.4) der Klone ohne unterbrochenes LacZ-Gen, und somit die Identifizierung von Klonen mit und ohne Insert, ermöglicht.



Reverse Primer

5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'
 5' - GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCCTCACTAAAGGGAAC
 3' - CCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTTCGAGCTTTAATTGGGAGTGATTTCCCTTG

T3 Primer

5' -ATTAACCCTCACTAAAG-3'

Reverse KS Primer

5' -TCGAGGTCGACGGTATCG-3' EcoRI
 AAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCG
 TTTTCGACCCATGGCCCGGGGGGAGCTCCAGCTGCCATAGCTATTTCGAACTATAGCTTAA
 KpnI

SmaI EcoRV SacI
 AATTCCTGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTC
 GGACGTCGGGCCCCCTAGGTGATCAAGATCTCGCCGGCGGTGGCGCCACCTCGAG
 3' -CCTAGGTGATCAAGATCTCGC-5'

Forward SK Primer

CAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAA -3'
 GTTAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGTTAAGTGACCGGCAGCAAAATGTT -5'
 3' -GGATATCACTCAGCATAA-5'

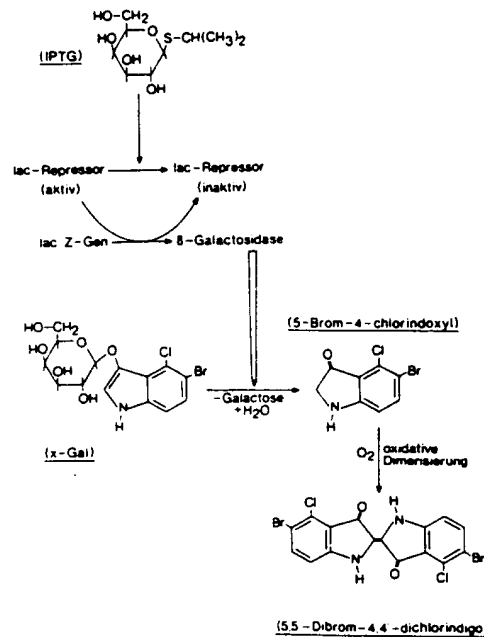
T7 Primer

Abbildung 3 Vektorkarte des pBlueskript SK Plasmidvektors.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Plasmids sowie die Sequenz der 'Multiple Cloning Site' (MCS). Gekennzeichnet sind die Sequenzen von Restriktionsschnittstellen und Sequenzierungsprimern. Bei pBlueskript KS Vektoren ist die Orientierung der 'Multiple Cloning Site' invertiert.

Abbildung 4

Farbnachweis des intakten β -Galaktosidasegens (von pBlueskriptvektoren™). IPTG fördert durch Wechselwirkung mit dem Repressor des β -Galaktosidasegens die Expression von β -Galaktosidase. Diese wandelt x-Gal in ein Indoxylzwischenprodukt um, welches mit Luftsauerstoff zu einem blauen Indigoderivat dimerisiert.



3.4 DNA-Quantitierung mit PCR

DNA Vervielfältigungen lassen sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$c = c_0 a^z \quad \text{Gleichung 1}$$

Dabei ist c die Menge an amplifizierter DNA, c_0 die Anfangskonzentration an Template, z die Anzahl der PCR-Zyklen und a die Effektivität der PCR. Im Idealfall wird in jedem Zyklus für jeden Teilstrang der doppelstängigen Template-DNA ein Gegenstrang gebildet, wodurch sich die Menge verdoppelt. Dies entspräche einer Effektivität, a von 2. In der Praxis liegen die Effektivitäten zwischen 1 und 2. Gleichung 1 gilt nur im 'logarithmischen Bereich' der PCR, in dem ein Nachlassen der Effektivität aufgrund großer Produktmengen praktisch nicht zu bemerken sind. Gleichung 2 gibt die logarithmische Form von Gleichung 1 an:

$$\log c = \log c_0 + z \log a \quad \text{Gleichung 2}$$

Dies ist eine Geradengleichung für die Auftragung der amplifizierten DNA-Mengen gegen die Zyklenzahlen. Die Geradensteigung ist dabei ein Maß für die PCR-

Effektivität und der Ordinatenschnittpunkt ein Maß für die anfängliche Templatekonzentration. Produkte aus PCRs mit geringen anfänglichen DNA-Konzentrationen lassen sich üblicherweise nach 25 bis 30 Zyklen auf Agarosegelen nachweisen. Für geringe DNA-Mengen eignet sich dabei besonders der Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green™. Nach einer Methode von Becker et al. (1996) werden die PCR-Produktmengen aus Amplifikationen mit verschiedenen vielen Zyklenzahlen bestimmt. Die logarithmische Auftragung der Produktmengen gegen die Zyklenzahlen ermöglicht es dann über den Ordinatenabschnitt einer Regressionsgeraden auf die DNA-Anfangsmenge zurückzuschließen.

Die Quantitierung der PCR-Produktmengen erfolgt über Sybr-Green™ angefärbte Agarosegele, auf denen PCR-Proben, die bei gleichen Bedingungen mit verschiedenen Zyklenzahlen amplifiziert wurden, aufgetragen werden. In Vergleichsspuren werden definierte Mengen eines DNA-Fragments aufgetragen. Die angefärbten Gele werden ultraviolett belichtet und über einen Scanner per Computer ausgewertet. Dazu dient ein Programm, das die Bandenintensität über die von einer Bande erzeugten Bildpunkte ermittelt. Aus den Fragmenten in den Vergleichsspuren wird die Anzahl von Bildpunkten pro ng DNA bestimmt. Mit diesem Normierungswert lassen sich die DNA-Mengen der Fragmente in den übrigen Spuren bestimmen.

4 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
As	Aminosäure
bideest	bidestilliert
b	Basen
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementäre DNA
Ci	Curie
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithioerythritol
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid
kb	Kilobase
kV	Kilovolt
kVh	Kilovoltstunden
mA	Miliampere
min	Minuten
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	'Polymerase Chain Reaction'
PEG	Polyethylenglycol
RACE	'Rapid Amplification of cDNA Ends'
RNA	Ribonucleinsäure

RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
TEMED	N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin
T _H	Hybridisierungstemperatur
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Weiss Units (~Enzymaktivität)
UV	Ultraviolettlicht
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-galactosid

Abkürzungen für Nukleotidbasen:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
I	Inosin

Abkürzungen für Nukleotidkombinationen:

H	A, C, T
R	A, G
Y	C, T

5 Materialliste

5.1 Geräte

Brutschrank BE 30	Memmert, Schwalbach
Laborautoklav	Wolf, Geislingen
Schüttelinkubator mit Heizhaube	Infors, Bern
	Braun, Melsungen
Speed-Vac concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Transilluminator (302 nm)	Bachhofer, Reutlingen
Vortex	Bender & Hobein, Zürich
Zweistraßspektrometer Uvicon 810	Kontron, Offenbach
amicon™ Microcon 100 Filter	amicon, Danvers (USA)
Variopipetten	Abimed, Düsseldorf
Elektrophoreseapparaturen:	
für Agarosegele	Pharmacia, Freiburg
	Hauseigene Werkstatt
für Sequenzgele	
Sequenzgelapparatur Modell S2	Gibco BRL, Karlsruhe
Röntgenfilme	
BioMax	Röntgen Bender, Berlin
X-Omat	Kodak, Rochester (UK)
Cups 0.5 ml , 1.5 ml , 2ml	Sarstedt, Düsseldorf
	Eppendorf, Hamburg
Einwegmaterial (steril)	Geiner, Nürtlingen
(Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen)	Falcon, Heidelberg
Sterilfilter (0.45µm, 0.2µm)	Schleicher & Schüll, Dassel

Zentrifugen

Minifuge RF, kühlbar

Haereus, Osterode

Biofuge A, B

Haereus, Osterode

Tischzentrifuge

Hettich, Tutlingen

Beckmann, München

Eppendorf, Hamburg

SS34 Rotor

DuPont, Bad Nauheim

Zentrifugenbecher

Beckmann, München

Kontron, Offenbach

5.2 Kits, DNA MarkerDNA-Sequenzierungskit T⁷ Sequencing

Pharmacia, Freiburg

Plasmitisolierungskits Mini und Midi

Qiagen, Hilden

Jet-Sorb Gelextraktionskit

Genomed, Bad Oeynhausen

'Nucletrap'-Extractionkit für Agarosegele

Marchery Nagel, Düren

High-Fidelity PCR System

Boehringer, Mannheim

MassLadder

Gibco BRL, Karlsruhe

BioLadder

Angewandte Gentechnologie

Systeme (AGS), Heidelberg

MBI Fermentas, St.Leon-Roth

5.3 Bakterienstämme, Vektoren5.3.1 Bakterienstamm

E.coli XL1 Blue

Stratagene, Heidelberg

5.3.2 Vektoren

PUC 18

pBluescript II SK+/KS+/KS-

Pharmacia, Freiburg

Stratagene, Heidelberg

5.4 Primer

Primer wurden von Dr. Krause im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Fb Medizin synthetisiert oder von Eurogenetics (Brüssel) bezogen.

VIa+1	5 ' CARGGITCICAYGARGG3 '
VIa+2	5 ' CARGGIAGYCAYGARGG3 '
VIa+3	5 ' CAYGAYCCTCCIGARTTYGT3 '
VIa-6	5 ' TAGTGTGCTAATTGGCC3 '
VIa-5	5 ' TAGTAATCAGGGAAGGTGG3 '
VIa-4	5 ' GTTGTGGAAGAGAGAGTGG3 '
Va+1	5 ' ACIGAYGARGARTTYGAYG3 '
Va+2	5 ' GAAYACIYTIATHGGITAYG3 '
Va-5	5 ' AGCCAGATCCTCAGGTGTGG3 '
Va-4	5 ' ATCAGAGTGGGCTGCAG3 '
Va-3	5 ' GGGTAGATATCTTTGTGG3 '
Q ₀	5 ' CCAGTGAGCAGAGTGACG3 '
Q _I	5 ' GAGGACTCGAGCTCAAGC3 '
Q ₀ Q _I dT ₁₇ (=Q _T)	5 ' CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC (T) ₁₇ 3 '

Die vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung bezogenen Primer wurden mit 32%igem Ammoniak von der Syntheseäule gespült und darin zum

Abspalten der Schutzgruppen übernacht inkubiert. Vor dem Gebrauch wurden diese Primer nach 6.3.10 vorbehandelt.

5.5 Enzyme und zugehörige Puffer

5.6 Modifizierende Enzyme

M-MuLV Reverse transkriptase	Angewandte Gentechnologie Systeme (AGS), Heidelberg
DNA-Polymerase, Klenow Fragment	Amersham, Braunschweig
Klenow Fill In 10xPuffer	Amersham, Braunschweig
RNase A	Serva, München
	Qiagen, Düsseldorf
T4 DNA Ligase	Amersham, Braunschweig
Shrimp-Alkalische Phosphatase	Amersham, Braunschweig

5.7 Restriktionsenzyme

EcoRI	USB, Bad Homburg
	Boehringer Mannheim
PvuII	USB, Bad Homburg
	Boehringer, Mannheim
SmaI	USB, Bad Homburg
EcoRV	USB, Bad Homburg

5.8 Substanzen für Nährmedien

Pepton 140	Gibco BRL, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL, Karlsruhe
NZY-Boullion	Gibco BRL, Karlsruhe
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose (high EEO)	Serva, Heidelberg

5.9 Antibiotica

Ampicillin	Serva, Heidelberg
------------	-------------------

5.10 Reagentien für die Elektrophorese

Agarose ultrapure	Gibco BRL, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
N,N' -Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Riedl-de-Haen, Seelze

5.11 Radioaktives Material

$\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (Aktivität > 1000 Ci/mmol)	Amersham, Braunschweig
--	------------------------

5.11. Färbereagentien

Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, München
Xylencyanol FF	Sigma, München
Syber-green I Stammlösung	Mobitech, Eugene (USA)

5.12. Chemikalien

3-Methylacryloxypropyltrimethoxysilan	Sigma, München
BSA Fraktion V	Sigma, München
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Fluka, Buchs (CH)
Dextransulfat	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid	Fluka, Buchs (CH)
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
DNA-Längenstandard Mass Ladder	Gibco BRL, Karlsruhe
DNA-Längenstandard BioLadder	Biozym
DTT	Roth, Karlsruhe
Gelatin	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumisothiocyanat	Fluka, Buchs (CH)
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
IPTG	Sigma, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, München
Natrium-Lauroyl-Sarcosinat	Fluka, Buchs (CH)
Nonanukleotidmix	Amersham, Braunschweig
Phenol (Rotiphenol equilibriert)	Roth, Karlsruhe

Polyethylenglykol 4000, 6000	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Sigmacote	Sigma, München
Tris-Cl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, München
Triton X-114	Sigma, München
Tween 20	Serva, Heidelberg
X-Gal	Sigma, München

Alle weiteren hier nicht aufgelisteten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a. und wurden über das Institut von den Firmen Merck, Darmstadt und Riedl-de-Haen, Seelze bezogen.

5.13 Medien, Puffer, Lösungen und Stammlösungen

5.13.1 Medien

Soweit nicht anders angegeben wurden diese Lösungen mit bidest. Wasser angesetzt und 30 min bei 120° C hitzesterilisiert.

a)	LB Medium	pro Liter	10 g NaCl 10 g Peptone 140 5 g Hefeextrakt 10 ml 1M MgSO ₄ 5 ml 1n NaOH
b)	2xTY Medium	pro Liter	16 g Bacto-Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl

c) NZY Broth

pro Liter 10 g NZ Amine (Casein Hydrolysat)
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

oder 21 g NZY-Fertigboullion pro Liter

d) Bottom Agar Top Agarose Top Agar

1 l Medium	1 l Medium	1 l Medium
15 g Agar	7 g Agarose(highEEO)	7 g Agar

optional als sterilfiltrierte Lösungen nach dem Autoklavieren (bei
 ca. 60° C) zuzugeben:

2.5 ml 4% (w/v) X-Gal in DMF
 0.5 ml 100 mM IPTG
 0.5 ml 50 mg/ml Ampicillin

5.13.2 Puffer

10xTBE für Agarosegele

0.892 M Tris-Cl
 0.892 M Borsäure
 20 mM EDTA
 pH 8.3

10xTBE für Sequenzgele

1 M Tris-Cl
 0.83 M Borsäure
 20 mM EDTA
 pH 8.6

6xAuftragspuffer für Agarosegele 50% (v/v) Glycerin
0.25% Bromphenolblau
0.25% Xylencyanol FF

Auftragspuffer für Sequenzgele (=Stopplösung)

500 mM EDTA in Formamid
0.5% Bromphenolblau
0.5% Xylencyanol FF
bei -20° C gelagert

Reverse Transkriptasepuffer

500 mM Tris-Cl pH 8.3
6 mM MgCl₂
400 mM KCl
500 µg/ml BSA

RNase A Puffer

10 mM Tris-Cl pH 7.5
15 mM NaCl

10xKlenow DNA Polymerase Puffer

0.5 M Tris-Cl pH 7.5
0.1 M MgCl₂
10 mM DDT
0.5% (w/v) Gelatin

10x T4 DNA Ligase Puffer

0.5 M Tris-Cl pH 7.5
0.1 M MgCl₂
0.1 M DTT
10 mM ATP
0.5% (w/v) Gelatin

10x Vent DNA Polymerase Puffer	200 mM	Tris-Cl	
	100 mM	KCl	
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	20 mM	MgSO ₄	
	1%	Triton X-100	
	pH 8.8		
5x Sequenase Puffer	200 mM	Tris-Cl	pH 7.5
	250 mM	NaCl	
	100 mM	MgCl ₂	
Sequenaseverdünnungspuffer	10 mM	Tris-Cl	pH 7.5
	5 mM	DTT	
	0.5 mg/ml	BSA	
3M Natriumacetat pH 4.8-6.0	3 M	NaAc	pH mit Eisessig einstellen
20x SSC	3 M	NaCl	
	300 mM	Na ₃ Citrat	
	pH 8.8		
TE 10/1 Puffer	1 mM	EDTA	
	10 mM	Tris-Cl	
	pH 7.5 , 8.0 , 8.5		
TFB1	100 mM	RbCl	
	50 mM	MnCl ₂	
	30 mM	Kac	pH 5.8
	10 mM	CaCl ₂	
	15 %	Glycerin	

TFB2	10 mM	MOPS	pH8.0
	10 mM	RbCl	
	75 mM	CaCl ₂	
	15 %	Glycerin	
D-Puffer zur RNA-Isolierung	25 g	Guanidiniumisothiocyanat	
	29.3 ml	H ₂ O	
	17.6 ml	0.75 M Natriumcitrat	pH 7
	26.4 ml	Natrium-Lauroyl-Sarcosinat	

0.36 ml β -Mercaptoethanol / 50 ml -kurz vor Gebrauch zugeben

TENS	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
	0.1 n	NaOH
	0.5 %	SDS

Jet-Sorb Puffer:

Jetsorb Suspension	Jetsorb	
	30% (v/v)	Ethanol
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-Cl
	pH 6.0	

A1	7 M	NaClO ₄	A2	70% (v/v)	Ethanol
	66 mM	Sorbit		10 mM	NaCl
	30 mM	NaAc		1 mM	EDTA
	pH 5.1			10 mM	Tris-Cl
				pH 7.5	

Qiagen Puffer:

P1	50 mM	Tris-Cl	P2	200 mM	NaOH
	10 mM	EDTA		1% (w/v)	SDS
	100 µg/ml	RNase A			
	pH 8.0	bei 4° C gelagert	P3	2.55 M	KAc pH 4.8
QBT	750 mM	NaCl			
	50 mM	MOPS			
	15% (v/v)	Ethanol			
	0.15% (w/v)	Triton X-100			
	pH 7.0				
QC	1 M	NaCl	QF	1.25 M	NaCl
	50 mM	MOPS		50 mM	MOPS
	15% (v/v)	Ethanol		15% (v/v)	Ethanol
	pH 7.0			pH 8.2	

5.13.3 Lösungen

Ampicillin Stammlösung	50 mg/ml	Ampicillin	bei -20° C gelagert (unter Zugabe von NaOH gelöst)
IPTG Stammlösung	100 mM	IPTG	bei -20° C gelagert
X-Gal Lösung	4% (w/v)	X-Gal	in DMF bei -20° C lichtgeschützt aufbewahrt

Lösungen für Sequenzgele:

Bindesilanmischung für	15 µl	Eisessig
Sequenzgelrückenplatten	15 µl	3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan
	5 ml	Ethanol

APS 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in Wasser

Acrylamidstocklösung (AAMidstock)

38% (w/v)	Acrylamid
2% (w/v)	N,N' -Bismethylenacrylamid

Acrylamidgellösungen

6% Gele

pro Liter	150 ml	AAMidstock		
	50 g	Harnstoff		
20 ml	5xTBE		20 ml	5xTBE

Waschlösung für Sequenzgele	10% (v/v)	Eisessig
	10% (v/v)	Methanol

dNTP Lösung für PCR	2 mM	dATP
	2 mM	dCTP
	2 mM	dGTP
	2 mM	dTTP

Chloroform/Isoamylalkohol	4% Isoamylalkohol in Chloroform lichtgeschützt aufbewahrt
---------------------------	--

Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid bei 4° C lichtgeschützt aufbewahrt
----------------------	--

4x Entwickler für Röntgenfilme

pro Liter	4 g Metol
	52 g Na ₂ SO ₃ (H ₂ O-frei)
	12 g Hydrochinon
	104 g Na ₂ CO ₃ (H ₂ O-frei)
	4 g Kaliumbromid

Fixierer für Röntgenfilme

pro Liter	200 g Natriumthiosulfat
	20 g Kaliumbisulfit

5.14 Tiere

Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri iredeus*) wurden von dem Fischzuchtbetrieb Heck in Münchhausen bei Marburg gekauft.

6 Methoden

6.1 Sicherheitsbestimmungen

Die im Folgenden aufgeführten Arbeiten mit Bakterienstämmen und Bakteriophagen wurden gemäß dem Gentechnikgesetz vom 20. Juni 1990 durchgeführt.

Die Arbeiten wurden nach den Auflagen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Abfälle, die Microorganismen oder deren Plasmide, wurden durch Sterilisieren bzw. Denaturieren vernichtet.

Versuche, die mit radioaktiven Isotopen (^{35}S) durchzuführen waren, wurden in dafür ausgewiesenen Räumen hinter einer zur Strahlungsabschirmung geeigneten Plexiglasschutzscheibe ausgeführt. Außerdem wurde bei diesen Arbeiten geeignete Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe, Schutzbrille) getragen.

Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Chemikalien wurden unter einem Abzug durchgeführt. Dabei wurde geeignete Schutzkleidung (Handschuhe) getragen. Anfallende Abfälle wurden getrennt gesammelt und entsorgt.

6.2 Allgemeine Bemerkungen

Mit Bakterien oder deren Nukleinsäuren in Berührung gekommene Lösungen, Gefäße und andere Materialien wurden getrennt gesammelt und im Autoklaven 30 min bei 130° C und 2.5 bar Druck sterilisiert.

Die für Arbeiten mit Bakterien verwendeten Lösungen und Materialien (Gefäße, Pipettenspitzen) wurden vor Gebrauch ebenfalls im Autoklaven sterilisiert. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden durch einen Filter sterilfiltriert.

6.3 Standardmethoden

6.3.1 Gießen von Agarplatten

Die Medien wurden autoklaviert und nach dem Abkühlen auf ca. 50° C, wenn nötig, mit Stammlösungen von Ampicillin, X-Gal und IPTG versetzt. Anschließend wurde das warme Medium auf einem Nivelliertisch in sterile Petrischalen gegossen, so daß der Boden bedeckt war. Auftretende Luftblasen wurden durch kurzes Abflämmen mit dem Bunsenbrenner sofort entfernt.

Für eine kleine Platte mit 87mm Durchmesser wurden ca. 20 ml Medium benötigt.

Die Platten wurden nach dem Erstarren in Tüten verpackt und mit dem Deckel nach unten bei 4° C bis zu 3 Monate gelagert. Vor Gebrauch wurde jede Platte bei 37° C im Brutschrank vorgewärmt.

6.3.2 Gewinnung einzelner Bakterienkolonien

5 ml Flüssigmedium wurden mit ca. 10 µl einer Bakterienglycerinkultur angeimpft und 5-6 h bei 300 rpm unter kräftigem Schütteln bei 37° C inkubiert. Ein Tropfen dieser Kultur wurde mit einer ausgeglühten Platinöse in geraden Linien auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde übernacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert und konnte, mit Parafilm verschlossen, bis zu zwei Monate aufbewahrt werden.

6.3.3 Anlegen von Übernachtskulturen

Mit einer sterilen Pipetenspitze wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte gepickt, in 2 - 50 ml Flüssigmedium überführt und übernacht bei 37° C unter ständigem Schütteln oder Drehen des Gefäßes vermehrt.

6.3.4 Anlegen von Glycerinkulturen

Ein Aliquot einer Übernachtskultur wurde mit dem gleichen Volumen Glycerin versetzt und bei -20° C oder -80° C gelagert.

6.3.5 Photometrische Quantitierung von DNA

Es wurden die Extinktionen bei 260 und 280nm gemessen. Als Referenz wurde das Medium, in dem die DNA gelöst war, verwendet.

Aufgrund des Wertes von 50 µg/ml* für eine Extinktion bei 260 nm von 1 wurde die DNA-Konzentration in der Probenküvette aus der gemessenen Extinktion bei 260nm berechnet.

Die Umrechnung in molare Konzentrationen erfolgte aufgrund der DNA-Länge und der durchschnittlichen Masse von 330 g/mol für eine Base (bei ssDNA) bzw. 660 g/mol für ein Basenpaar (bei dsDNA).

Der Quotient aus den gemessenen Extinktionen bei 260nm und bei 280nm (E_{260}/E_{280}) diente als Aussage über die DNA Reinheit: saubere DNA ergab Werte zwischen 1.8 und 2.2 .

* abweichende Standardwerte galten bei ssDNA 40 µg/ml und bei Primern und bei Oligonukleotiden 33 µg/ml

6.3.6 Fällern und Waschen von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit einem Zehntel des Volumens 3M NaAc (pH4.6-5.5) sowie dem dreifachen Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -70° C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 15min bei 15000g wurde der ethanolische Überstand

abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals abzentrifugiert (15min, 15000g) und nach erneutem Abnehmen des Überstandes 10min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann wahlweise in bidest. H₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

6.3.7 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Reaktionen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer durchgeführt. Es wurden DNA-Konzentrationen zwischen 0.1 µg/µl und 1µg/µl gewählt und je 1-2U Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt. Die Größe des Ansatzes wurde so gewählt, daß die Enzyme (die mit 50% Glycerin vermischt vorlagen) mindestens 1:10 verdünnt wurden. Die Inkubationszeiten lagen zwischen einer und zwölf Stunden (übernacht), die Temperaturen zwischen 35 und 38° C.

Bei Mehrfachverdaus mit Enzymen, die verschiedene Inkubationspuffer benötigten, wurde mit dem Enzym begonnen, das die niedrigste Salzkonzentration benötigte.

Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Reaktionsansätze wurden entweder direkt für eine Agarosegelelektrophorese verwendet oder durch Zugabe von EDTA auf 10mM und fünfzehnminütiges Erhitzen auf 72° C gestoppt.

6.3.8 Agarosegelelektrophorese

6.3.8.1.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Eine 1xTBE Lösung (für Agarosegele) wurde zu 0.7-2% (w/v) mit Agarose versetzt und kurz aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 55° C wurde die Mischung 1:20000 (v/v) mit Ethidiumbromidstammlösung versetzt und in eine mit einem Gelkamm versehene Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit 1xTBE überschichtet und der Kamm herausgezogen.

Die DNA-Proben (30 ng - 2 µg pro Tasche) wurden mit einem Sechstel ihres Volumens 6xProbenpuffer versetzt und in die Geldaschen pipettiert. Es wurde eine konstante Stromstärke zwischen 80 und 180 mA angelegt. Zum Schluß wurden die

DNA-Banden auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht.

6.3.8.1.2 Agarosegelelektrophorese mit 'Syber-green I'-Fluoreszenzfarbstoff

Diese Methode erlaubte den Nachweis von sehr viel geringeren DNA-Mengen als die Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid (6.3.8).

Ein Agarosegel wurde wie beschrieben (6.3.8) gegossen, wobei der Gelmischung kein Ethidiumbromid zugegeben wurde. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel im Dunkeln in einer 1:10000 (v/v) Verdünnung von 'Syber-green I'-Stammlösung für 30min bei 4° C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Banden auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302nm sichtbar gemacht.

6.3.8.2 Agarosegelelektrophorese von RNA

1.3 g Agarose wurde in einer Suspension mit 90 ml Wasser und 12.5 ml MOPS-Puffer aufgekocht. Anschließend wurden im Abzug 22 ml 37% Formaldehyd zugemischt und die Mischung in eine Gelkammer gegossen. Es wurde darauf geachtet, daß die Gelmischung vor dem Gießen möglichst wenig abkühlte, um Inhomogenitäten zu vermeiden. Nach dem Festwerden wurde das Gel mit MOPS-Puffer überschichtet und der Kamm herausgezogen.

Je 5.5 µl einer RNA-Probe wurde mit 1 µl Ethidiumbromid, 2 µl MOPS-Puffer, 3.5 µl 37% Formaldehyd sowie 10 µl Formamid vermischt, 15 min bei 65° C denaturiert und 5 min auf Eis gekühlt. Dieser Ansatz wurde vermischt mit 3 µl Auftragspuffer in eine Geltasche pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 80 bis 100 V über drei bis vier Stunden durchgeführt.

6.3.9 Quantitierung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Es wurde eine Agarosegelelektrophorese nach 6.3.8 oder 6.3.8 durchgeführt. Dabei wurde neben der zu quantifizierenden DNA einer Konzentrationsreihe einer quantifizierten Marker-DNA ('DNA-Mass Ladder', Tabelle 6-1) aufgetragen. Durch Vergleich der Intensitäten der DNA-Banden mit denen der quantifizierten Marker-DNA konnte die DNA bestimmt werden.

Tabelle 2: Fragmentmengen des Markers 'DNA Mass Ladder' in Abhängigkeit von der Auftragsmenge

	A u f t r a g s m e n g e		
Fragmentgröße	2µl	4µl	8µl
2000bp	100ng	200ng	400ng
1200bp	60ng	120ng	240ng
800bp	40ng	80ng	160ng
400bp	20ng	40ng	80ng
200bp	10ng	20ng	40ng
100bp	5ng	10ng	20ng

6.3.10 Vorbehandlung der synthetischen Primer

Bei neu synthetisierten Primern mußten vor dem Gebrauch erst Ammoniakreste aus der Primersynthese entfernt werden. Dazu wurden die Lösungen zunächst in einem Eppendorfcup in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Cups mit offenem Deckel im 'Speedvac'-Konzentrator unter Vakuum zentrifugiert, bis das DNA Pellet trocken war. Das Pellet wurde in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

6.3.11 Siliconisieren von Glasgeräten

Die zum Gießen von Sequenzgelen verwendeten Glasplatten mußten so vorbehandelt werden, daß das Gel nach dem Lauf auf einer Platte fixiert war.

Dazu wurde die Frontplatte mit 2-3ml Sigmacote abgerieben.

Die Rückenplatte, auf der das Gel fixiert werden sollte, wurde mit einer Mischung aus 15µl Eisessig, 15µl 3-Methylacryloxypropyltrimethoxysilan und 5ml Ethanol abgerieben.

6.3.12 Sequenzgele

6.3.12.1 Hochspannungspolyacryamidgelelektrophorese

Zwischen die (nach 6.3.14) behandelten Glasplatten wurden zum Abdichten an drei Seiten ca 1cm breite Streifen aus 3MM Whatmann Filterpapier gelegt, die als Abstandhalter dienten. Das Papier wurde mit Metallklammern fixiert.

75ml 4-6% Acryamidlösung wurden mit einer Spritze durch einen Sterilfilterhalter mit einer Porengröße von 0.45µm filtriert. Als Polymerisationsstarter wurden 12.5µl TEMED und 750µl 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat hinzugegeben. Das Gemisch wurde sofort zwischen die Glasplatten gegossen. Ein Haifischzahnkamm wurde mit seiner glatten Seiten am oberen Ende des Geles zwischen die Glasplatten geschoben. Das Gel wurde während der Polymerisation in einer nahezu horizontalen Lage aufbewahrt.

Das polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Gelkammern wurden mit 1xTBE für Sequenzgele gefüllt. Der Kamm wurde herausgezogen und die dabei entstandene Tasche mit Laufpuffer gespült. Danach erfolgte ein einstündiger Vorlauf bei 35 Watt.

Die Tasche wurde nochmals mit Laufpuffer gespült und der Kamm mit den Spitzen auf den Gelrand gesetzt. Nach einem weiteren Vorlauf für 10 - 15 min bei 30 Watt wurden die denaturierten Proben in die gebildeten Taschen pipettiert.

Die Auftrennung erfolgte bei 30 Watt und je nach Länge des Laufs in 3 bis 6 Stunden.

Damit die schwache β -Strahlung der verwendeten ^{35}S -Markierungen nicht durch Streuung unkenntlich wurde, mußten die Sequenzgele getrocknet werden :

Nach dem Lauf wurde die Frontplatte abgenommen und das Gel auf der Rückenplatte 20 min in einer wässrigen Lösung mit 10% Eisessig und 10% Methanol gewaschen. Das Gel wurde nochmals mit Wasser abgespült und eine Stunde bei 100° C im Trockenschrank getrocknet. Das getrocknete Gel wurde bei Raumtemperatur autoradiographiert.

Zum Ablösen von der Glasplatte wurde das Gel in Wasser eingeweicht.

6.3.12.2 Salzgradientensequenzgelelektrophorese

Durch diese Methode wurden die Banden im unteren Teil des Gels komprimiert, wodurch längere Sequenzen pro Lauf gelesen werden konnten.

Das Gel wurde wie in 6.3.15. beschrieben gegossen. Die obere Pufferkammer (an der Kathode) wurde mit 0.5xTBE für Sequenzgele und die untere mit 1xTBE gefüllt. Das Gel wurde wie in 6.3.15 gefahren mit dem Unterschied, daß ca. eine Stunde vor Ende des Laufs in die untere Pufferkammer 1/3 Vol. 3M Natriumacetat pH 5.0 gegeben wurde.

Das Gel wurde wie beschrieben (6.3.12.1) weiterbehandelt.

6.3.13 Autoradiographien

Auf das getrocknete Gel wurde im Dunkeln ein Röntgenfilm und darauf eine Glasplatte gelegt. Die Glasplatten wurden mit Metallklammern fixiert und lichtdicht verpackt. Autoradiographiert wurde über einen Zeitraum von 1 bis 5 Tagen bei Raumtemperatur.

Zum Entwickeln wurden die Filme im Dunkeln in Entwickler gewaschen, bis deutliche Schwärzungen zu erkennen waren (ca. 5min). Nach kurzen Abspülen mit Wasser wurden die Filme in Fixierer geschwenkt .

6.4 RNA-Präparationen

6.4.1 Allgemeine Maßnahmen beim Umgang mit RNA

Um die Aktivität bzw. Verunreinigungen von Rnasen und somit die Degradierung der RNA zu vermeiden wurden beim Umgang mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Wasser und sämtliche Lösungen, die keine organischen Stickstoffgruppen enthielten, wurden vorher mit 0.1% DEPC autoklaviert. Die Reaktionsgefäße wurden zusammen in einem Becherglas mit etwas Wasser/DEPC-Mischung (1000:1) autoklaviert oder übernacht bei 180° C gebacken. Messer und Pinzetten wurden mit DEPC-behandeltem Wasser gespült. Die eingesetzten Organe wurden möglichst sofort nach der Entnahme verarbeitet. Es wurden Handschuhe getragen und alle Arbeiten soweit wie möglich auf Eis durchgeführt. Die erhaltenen RNA-Präparationen wurden bei -20° C aufbewahrt.

6.4.2 Präparation von gesamt RNA

100 mg Gewebe wurden bei Raumtemperatur in 1 ml D-Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 100 µl 2M Natriumacetat pH4 und anschließend mit 1 ml equilibriertem Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) vermischt. Der Ansatz wurde 10 min geschüttelt und 15 min auf Eis stehengelassen. Die Phasen wurden 15 min bei 4° C und 15000g in einer Zentrifuge getrennt. Das DNA-haltige untere Fünftel der wässrigen Phase wurde in Reaktionsgefäß gelassen. Aus dem Rest der wässrigen Phase wurde die RNA eine Stunde lang bei -20° C mit 1 ml Isopropanol gefällt und danach 15 min bei 15000g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 300 µl D-Puffer gelöst sowie erneut mit 2 ml eiskaltem Ethanol gefällt und 15 min bei 15000g abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in Wasser aufgenommen.

6.4.3 Präparation von mRNA

100 bis 500 µg gesamt RNA in einem Volumen von 100 µl wurden mit 100 µl 'Oligotex'-Suspension der Firma Qiagen und 800 µl Verdünnungspuffer vermischt. Der Ansatz wurde 3 min bei 65° C erhitzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde 2 min bei 15000g zentrifugiert und der Niederschlag in 350 µl OW2 suspendiert. Es wurde wiederholt abzentrifugiert und mit OW2 gewaschen.

Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 20 µl 70° C warmen Elutionspuffer suspendiert und 5 min bei 70° C belassen. Anschließend wurde die Suspension 2 min bei 15000g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde noch ein zweites mal wie beschrieben eluiert und die Elutionsüberstände vereinigt.

6.5 Polymerasekettenreaktion ('PCR)

6.5.1 Standard PCR

Die Reaktionen wurden aus 0.1-50 ng in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

1 - 2 µl	DNA-Template
10 µl	10x dNTP-Lösung
10 µl	10x PCR-Puffer I
2 µl	10 mM MgSO ₄
1 - 5 µl	Forwardprimer (10 - 50 pmol)
1 - 5 µl	Reverseprimer (10 - 50 pmol)
0.5 µl	Vent (Exo-) DNA-Polymerase (1 U)

auf 100µl mit bidest. H₂O auffüllen

Mit Plasmiden als Templat-DNA wurden die Ansätze vor der PCR zur Denaturierung der Template-DNA für 4 min auf 94° C erhitzt.

Für die PCR wurden 25 bis 30 Zyklen mit folgenden Schritten gefahren:

Denaturierung 94° C 60 s

Annealing T_H 30 - 60 s

Elongation 72° C t'

Die Elongationszeit t' hängt von der Größe des zu amplifizierenden Fragments ab und lag meist bei 30 bis 60 s.

Die Hybridisierungstemperatur wurde für die verwendeten Primer nach folgender Formel abgeschätzt: $T_H = 4x(C+G)^\circ C + 2x(A+T)^\circ C$

Die Reaktionsprodukte wurden über ein Agarosegel charakterisiert.

6.5.2 Touch Down PCR

Dieses Verfahren wurde vor allem bei Primergemischen angewendet, bei denen kein bestimmter Schmelzpunkt abgeschätzt werden konnte.

Im Unterschied zur Standard PCR wurde dabei die Hybridisierungstemperatur im Verlauf der Reaktion bis zu einem bestimmten Wert abgesenkt. Dazu wurde in den ersten Zyklen nach jeweils zwei Zyklen die Hybridisierungstemperatur um je 2° C erniedrigt.

6.6 Abtrennung von Primern und Nukleotiden aus PCR Ansätzen

6.6.1 Reinigung von PCR Produkten mit Qiagen-Quick-Spin-Säulen

Dieses Verfahren wurde angewendet, um Proteine überschüssige Primer und Nukleotide von der amplifizierten DNA abzutrennen.

Der PCR Ansatz wurde mit 5 Volumen PB Puffer versetzt und auf eine Qiagen-Quick-Spin-Säule aufgetragen. Die Säule wurde auf ein 2 ml Auffanggefäß gesetzt und 60 s in einer Tischzentrifuge bei $\geq 10000g$ zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde entleert und 750 μ l PE auf die Säule aufgetragen. Es wurde 2x zentrifugiert (60 s $\geq 10000g$ Tischzentrifuge) und das Auffanggefäß jeweils entleert. Die Säule wurde auf ein frisches Auffanggefäß gesetzt und mit 50 μ l TE oder Wasser überschichtet. Durch erneutes Zentrifugieren (60 s $\geq 10000g$ Tischzentrifuge) wurde die DNA in das Auffanggefäß eluiert.

6.6.2 Reinigung von PCR Produkten mit amiconfiltern™

Die Probe wurde in das mit einem Filter versehene amiconröhrchen™ pipettiert und 15 min bei 300g gegen den Filter zentrifugiert. Die durchlaufende Flüssigkeit wurde dabei in einem 1.5 ml Cup aufgefangen. Das Röhrchen wurde umgekehrt in ein neues 1.5 ml Cup gesetzt und die Probe mit der auf dem Filter verbliebenen Flüssigkeit 1 min bei 500g in das Cup zentrifugiert. Mußte die Probe weiter ankonzentriert werden, so wurde sie wie beschrieben erneut in das Microconröhrchen pipettiert und ankonzentriert.

6.7 Reverse Transkription

1 µg mRNA bzw. 5 µg gesamt RNA wurden in folgendem Ansatz 3 min bei 80° C denaturiert:

2.5 µl 2 mM dNTP
0.25µl Rnasin (10U)
0.4 µl 0.1 M DTT
1.0 µl Primer (10 pmol)
x µl RNA _____
18.5 µl

Der Ansatz wurde 2 min auf Eis gekühlt und mit 2.5 µl Reverse-Transkriptase-Puffer und 2 µl (200U)Reverser Transkriptase 2 h bei 37° C inkubiert. Zum Schluß wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 70° C inaktiviert.

6.8 Polyadenylierung von DNA

Um 5'-Endsequenzen von RNA's mit PCR amplifizieren zu können wurde an den cDNA-Erststrang aus einer Reversen Transkriptasereaktion ein Poly(A)schwanz angehängt.

Dazu wurde der inaktivierte Reverse Transkriptasereaktionsansatz 20 min bei 37° C mit 1.5 U (0.3µl) RNaseH inkubiert, um den RNA-Teilstrang zu entfernen. Zum Abtrennen von überschüssigem Primer wurde der Ansatz mit TE pH 7.5 auf 400 µl aufgefüllt und wie beschrieben auf einer Microconsäule ankonzentriert.

Der so gereinigte cDNA-Erststrang wurde in folgendem Ansatz eingesetzt:

11 µl cDNA-Erststrang
4 µl 5xTranferasepuffer
4 µl 1 mM dATP
1 µl (1U) Terminale Desoxynukleotidtransferase

Die Reaktion wurde 5 bis 10 min bei 37° C durchgeführt und 5 min bei 65° C inaktiviert. Anschließend wurde der Ansatz mit TE pH 7.5 auf 500 µl aufgefüllt

6.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

6.9.1 'Jet-Sorb'-Elution von DNA

Es wurde ein Agarosegel gefahren und die DNA Banden mit UV-Licht von 302 nm sichtbar gemacht. Die gewünschte Bande wurde möglichst eng aus dem Gel ausgeschnitten und das erhaltene Gelstückchen gewogen. Pro 100mg wurden 300 µl A1 und 10 µl gevortexte Jetsorb Suspension zugesetzt.

Der Ansatz wurde bei 50° C 15 min, bzw. 20 min bei mehr als 100mg Gel, inkubiert. Dabei wurde das Reaktionsgefäß alle 5 Minuten kurz geschüttelt. Anschließend wurde die Jet-Sorb-Suspension 60 s in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet mit demselben Volumen wie zuvor in A1 durch kurzes Vortexen resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet im selben Volumen A2 ebenfalls durch kurzes Vortexen resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Es wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 20 µl Wasser oder 20 µl TE suspendiert. Zur Elution der DNA wurde bei 50° C 6 bis 10 min inkubiert (bei größeren Ansätzen aus über 100 µg Gel 10 min). Das Reaktionsgefäß wurde dabei alle 3 min kurz geschüttelt. Es wurde 60 s zentrifugiert und die DNA-haltige Lösung in ein frisches Gefäß abpipettiert.

6.9.2 'Nucleotrap'-Elution von DNA

Die Arbeitsschritte entsprachen denen der 'Jet-Sorb'-Elution; nur die Puffer und Waschschrte waren unterschiedlich: Das Gelstückchen wurde in 300 µl NT1 pro 100 mg Gel aufgeschmolzen. Das DNA-absorbierende Material wurde zweimal mit 500 µl NT2 und danach zweimal mit 500 µl NT3 gewaschen. Eluiert wurde wie bei der 'Jet-Sorb'-Elution.

6.10 Subklonierung

6.10.1 Herstellen von kompetenten Zellen

Eine E.coli XL1 Blue Kolonie wurde von einer Agarplatte gepickt und in Form einer Übernachtskultur angezogen.

Am nächsten Tag wurde $1/2$ ml der Übernachtskultur in 50 ml LB Medium (ohne Ampicillin) überimpft. und unter Schütteln (250-350 rpm) bis zu einer $OD_{590}=0.5$ inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein steriles Falconröhrchen überführt und 10 min auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden 10 min bei 4000 rpm und 4°C (Minifuge RF) abzentrifugiert und in 15 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Nach 90 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut 5 min bei 4000 rpm und 4°C (Minifuge RF) zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 2 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf mehrere Cups verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die eingefrorenen kompetenten Zellen konnten über mehrere Monate bei -80° C gelagert werden und wurden vor der Transformation auf Eis aufgetaut.

6.10.2 Vorbehandlung von Vektor und Insert

Wurden bei den zur Ligation eingesetzten DNAs (Vektor oder Insert) durch einen Restriktionsverdau Fragmente ab- oder herausgeschnitten, so mußten diese zur Vermeidung von Religationen abgetrennt werden. Dies geschah durch Eluieren der für die Ligation benötigten DNA aus Agarosegelen.

Wurden ungeschnittene PCR-Fragmente ligiert, so mußten Vektor und Insert -wie nachfolgend beschrieben- vorbehandelt werden.

6.10.2.1 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden

6.10.2.1.1 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden mit Vent-Polymerase

Um sicherzustellen, daß die einzuligierenden PCR-Fragmente glatte Enden hatten, wurden die PCR-Ansätze direkt im Anschluß an die PCR 10 min bei 72° C inkubiert.

6.10.2.1.2 Auffüllen von Doppelstrang-DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

PCR Fragmente, die mit der Polymerasekombination Taq/Pwo erzeugt wurden enthielten zu ca. 50% überhängende 3'Enden mit einem Adenosin. Diese wurden mit Klenow-DNA-Polymerase und Nukleotidtriphosphaten in folgendem Ansatz aufgefüllt:

0.5 µl	2 mM dNTP Lösung
0.5 µl	Klenowfragment (4U/µl)
2.5 µl	Klenowpuffer
22 µl	DNA (0.5 - 20 ng)

Die Reaktion wurde in 30 min bei 37° C durchgeführt und in 10 min bei 72° C gestoppt.

6.10.2.2 Dephosphorylieren von DNA

Um die Religation des mit einem 'Blunt End'Restriktionsenzym geschnittenen Vektors zu vermeiden, wurden dessen 5'Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Dazu wurden 2.5 µg linearisierter Plasmid-DNA mit 0.1 µl (4 U) Phosphatase und 5 µl 10xPhosphatasepuffer in einem Ansatz von 50 µl 3 h bei 37° C inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 70° C inaktiviert und mit Ethanol gefällt.

6.10.2.3 Phosphorylieren von DNA

Die 5'Primerenden der PCR-Fragmente wurden mit T4Polynukleotidkinase phosphoryliert. 10 bis 50 ng DNA in einem Volumen von 23.7 µl wurden mit 3.5 µl 10xKinasepuffer, 2.63 µl, 0.75 mM ATP und 5.25 µl einer 1:10 Verdünnung von Kinase in Kinaseverdünnungspuffer vermischt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37° C inkubiert, 10 min bei 70° C inaktiviert und mit Ethanol gefällt.

6.11 Ligation

6.11.1 Standardligation

Der Ligationsansatz enthielt ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:2

Ansätze:

i) Ligation:

150 ng DNA (Vektor und Insert)
2 µl 10xT4 Ligasepuffer
1 µl T4 DNA Ligase (1U)
1.5µl 50% PEG 6000

auf 20 µl mit H₂O auffüllen

ii) Negativtransformationskontrolle:

0.3 µg einmalverdaute Plasmid DNA

iii) Ligationskontrolle:

50 ng einmalverdaute Plasmid DNA

2 µl 10xT4 DNA Ligasepuffer

1 µl T4 DNA Ligase (1U)

1.5 µl 50% PEG 6000

auf 20 µl mit H₂O auffüllen

Die Ansätze wurden 16 Stunden bei 16° C oder 5 bis 6 h bei Raumtemperatur hinkubiert. 7 µl der Ansätze wurden in kompetente E.coli Zellen transformiert.

6.11.2 Transformation

Agarplatten aus LB Medium mit X-Gal, IPTG und Ampicillin wurden bei 37° C vorgewärmt. Als Transformationspositivkontrolle wurde ein Aliquot Vektorplasmid DNA (10ng) transformiert.

Je 100 µl kompetente Zellen wurden mit den Ligations- und Kontrollansätzen versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 s bei 43° C wurden 500 µl LB (ohne Ampicillin) zugegeben und 60 min bei 37° C inkubiert. Um bei hoher wie bei niedriger Ausbeute an Transformanten Agarplatten mit einer Bakteriendichte zu erhalten, die eine Isolierung einzelner Klone erlaubt, wurden Ansätze in Aliquots von 150 µl und 450 µl aufgeteilt. Anschließend wurden diese Aliquots mit Trigalsky-Spateln (Glasstäbe in Triangelform) auf den vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen. Nach dem die ausgestrichenen Suspensionen in die Agarplatte eingezogen waren, wurden diese übernacht bei 37° C inkubiert.

6.12 DNA Präparationen

6.12.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Die Bakterien einer 3 - 5 ml Übernachtskultur wurden in einer Tischzentrifuge 2 min bei 10000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 0.4 ml P1 suspendiert. Nach Zugabe von 0.4 ml P2 wurde 30 min bei 37° C inkubiert.

Es wurden 0.4 ml P3 zugegeben und 2x 15 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem Überstand mit 0.8 ml Isopropanol gefällt und in einer Tischzentrifuge 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Wasser aufgenommen. Mit dieser Lösung wurde eine Ethanolfällung nach 6.3.6 durchgeführt.

6.12.2 Präparation mit dem 'Qiagen Plasmid Kit'

Diese Präparation wurde in zwei verschiedenen Größenordnungen durchgeführt: für 50 ml - und für 3 - 5 ml Übernachtskulturen.

Die Bakterien einer Übernachtskultur wurden 10 min bei 4000 rpm (Minifuge RF) pelletiert und das Pellet in 4 ml (bzw. 0.4 ml) P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml (bzw. 0.4 ml) P2 wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 4 ml (bzw. 0.4 ml) P3 zugemischt und 2x bei $\geq 15000g$ und 4° C zentrifugiert.

Währenddessen wurde eine Qiagen-tip 100 (bzw. Qiagen-tip 20) Säule mit 3 ml (bzw. 1 ml) QBT equilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf die Säule aufgetragen. Nach dem Durchlaufen der Lösung wurde die Säule 2x mit 5 ml (bzw. 1ml) QC gewaschen.

Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 5 ml (bzw. 0.8 ml) QF eluiert und mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt. Die DNA wurde 30 min bei $\geq 15000 g$ abzentrifugiert (15000 rpm, SS34 Rotor in Corex Röhrchen bzw. Tischzentrifuge). Das Pellet wurde in 100 µl Wasser aufgenommen und anschließend eine Ethanolfällung nach 6.3.7. durchgeführt.

6.12.3 TENS-Plasmidpräparation

Dieses Verfahren wurde Standardmäßig bei der Untersuchung von vielen cDNA-Klonen aus einer Subklonierung verwendet.

2 bis 4 ml einer Übernachtskultur wurden bei 9000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 50 bis 100 µl des im Zentrifugengefäßes verbliebenen Überstandes suspendiert. Es wurde 300 µl TENS zugegeben und 3 bis 5 s verwirbelt. Darauf wurden 150 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2 zugegeben und ebenfalls mit der Mischung 3 bis 5 s verwirbelt. Um das Denaturieren der DNA zu vermeiden, wurde darauf geachtet, daß zwischen der Zugabe von TENS und Natriumacetat nicht mehr als acht Minuten vergingen. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis stengelassen und anschließend 5 bis 10 min bei 15000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 900 µl kaltem Ethanol versetzt und 10 bis 15 min bei 15000g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Das im Vakuum getrocknete Pellet wurde in 50 bis 80 µl TE pH 7.5 mit 1µl einer 10mg/ml RNaseA-Stammlösung aufgenommen und 30 bis 60 min bei 37° C inkubiert.

6.13 DNA Sequenzierung

6.13.1 Denaturierung Doppelsträngiger DNA

Um die Hybridisierung eines Primers zu ermöglichen mußte Doppelsträngige DNA zunächst denaturiert werden. Dazu wurden 2 bis 6 µg DNA in einem Volumen von 32 µl mit 8 µl 2n NaOH versetzt und 10 min bei Raumtemperatur stengelassen. nach Zugabe von 4 µl Wasser, 7 µl 3M Natriumacetat pH 5.0 und 120 µl absolutem Ethanol wurde die DNA 20 min bei -20° C gefällt und anschließend 15 min bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit ca. 0.5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurde danach in 10µl Wasser aufgenommen und sofort für die Sequenzreaktion eingesetzt.

6.13.2 Sequenzreaktion

Es wurden die in dem verwendeten Sequenasekit (T7Sequenase-Kit von Pharmacia) enthaltenen Lösungen und Puffer verwendet. Die DNA-Polymerase wurde in einer Verdünnung von 1:8 in Sequenaseverdünnungspuffer eingesetzt. Für die Abbruchreaktionen wurden 2.5 µl ddATP Lösung, 2.5 µl ddCTP Lösung, 2.5 µl ddGTP Lösung und 2.5 µl ddTTP Lösung in 4 getrennten Eppendorf Cups auf 37° C vorgewärmt. Als markiertes Nukleotid wurde $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP verwendet.

Zur Sequenzierung wurden mit 5 µg Plasmid-DNA folgende Schritte nacheinander durchgeführt:

i) Hybridisierung des Primers

Ansatz: x µl DNA
 2 µl Annealingpuffer
 x µl Primer (10 pmol)

auf 14 µl mit Wasser auffüllen

Der Ansatz wurde in einem Wasserbad 5-10 min bei 65° C und anschließend 10 min bei 37° C sowie 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

ii) Labelling und Termination

Ansatz: 14 µl Primer/Template Gemisch (aus i)
 2 µl Desoxynukleotidmix
 0.5 µl $\alpha^{35}\text{S}$ dATP
 2 µl DNA Polymerase

Der Ansatz wurde kurz auf den Boden des Eppendorf Cups zentrifugiert, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den vier Didesoxynukleotidlösungen wurden je 4.4 µl des Ansatzes gemischt und 5 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde in die Reaktionsgefäße je 5 µl STOP Lösung zugemischt.

iii) Denaturierung und Auftrennung

Die Proben wurde 2 bis 5 min bei 95° C denaturiert. Von den vier Abbruchreaktionen wurden Aliquots von 1.5 bis 5 µl in vier nebeneinander liegende Taschen eines (warmgelaufenen) Polyacrylamidgels pipettiert. Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde wie beschrieben (6.3.12.1) durchgeführt.

6.13.3 Sequenzanalysen

Zur Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums und zur Berechnung von mRNA-Sekundärstrukturen wurden Programme verwendet, die unter der Softwaregruppe 'HUSAR' des Gendatenbankservers vom deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung standen.

6.13.3.1 RNA-Sekundärstrukturberechnungen

Für die Rechnungen wurde das Programm 'Mfold' verwendet, dem eine Methode von Zucker zugrunde lag (Zucker 1989), in der spezifische Faltungsenergien eingehen. Es wurden außer der energiegünstigsten Sekundärstruktur jeweils weitere, energetisch nächsthöher liegende Strukturen berechnet. Da sowohl das Modell als auch die darin eingehenden Faltungsenergien Unsicherheiten aufweisen, mußte jeweils nach Strukturelementen gesucht werden, die in vielen der berechneten

energiegünstigsten Faltungen enthalten waren. Weiterhin ist zu beachten, daß bei RNA Basenpaarungen zwischen Guanin und Uracil auftreten.

6.13.3.2 Phylogenetische Rechnungen

Phylogenetische Rechnungen wurden mit dem Programm 'EDNAMLK' durchgeführt, das auf einer Methode von Felsenstein beruhte (Felsenstein 1981) und von Nukleotidsequenzen ausgeht. In die Rechnungen gehen spezifische Wahrscheinlichkeiten für Mutationseignisse der Nukleotide A, C, G und T ein. Mit diesem Programm konnten relative phylogenetische Abstände zwischen verschiedenen Sequenztypen berechnet werden. Aus früheren Arbeiten von Saccone (saccone et al. 1991) wurde eine Zeitnormierung für die Differenzierung der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten V1a Leberformen von Ratte und Mensch übernommen. Damit konnten die berechneten relativen Abstände in Zeitangaben umgerechnet werden. Die Fehlerschwankungen der Zeitangaben sind dabei für phylogenetisch alte Ereignisse größer als für jüngere Entwicklungsereignisse.

7 Ergebnisse

7.1 Isolierung und Charakterisierung der cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forelle

7.1.1 Isolierung und Charakterisierung von 3'cDNA-Enden für die Untereinheit VIa

7.1.1.1 Amplifikation von 3'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa durch 3'RACE

Aus Peptidsequenzierungen waren bereits zwei kurze Sequenzabschnitte für die Untereinheit VIa aus Karpfen Cytochrom-c-Oxidase bekannt (Hüttemann et al). Um zu prüfen, ob sich diese Untereinheit auch in der Forelle nachweisen läßt, wurden aus den beiden Peptidsequenzabschnitten degenerierte Primergemische abgeleitet, die zur Amplifikation homologer cDNA Sequenzen in 3'Richtung dienen sollten. Die vordere dieser beiden Primersequenzen wurde dabei in zwei Primergemische VIa+1 und VIa+2 unterteilt um die Degeneration der Primer zu vermindern. Ein Vergleich der von den Primern codierten Karpfenpeptidsequenzen mit den bekannten, vollständigen Sequenzen für die Untereinheit VIa aus Ratte, Rind und Mensch ermöglichte es den Abstand der Primersequenzen auf einer möglichen homologen Forellen-cDNA abzuschätzen (Abbildung 5). Daraus mußte erwartet werden, daß die weiter in 3'Richtung der entsprechenden mRNA liegende Primersequenz VIa+3 ein PCR Fragment amplifiziert, das ca. 110 bp kürzer ist als eine mit den anderen Primern (VIa+1 bzw. VIa+2) erhaltene Amplifikation des 3'cDNA-Endes.

Das cDNA Template der PCRs wurde mit einer Reversen Transkriptasereaktion aus mRNA-Präparationen der Forelle gewonnen. Dabei wurde ein Poly-T Primer eingesetzt, der am 5'-Ende des Poly-T-Schwanzes mit zwei Primersequenzen Q₀ und Q₁ versehen war. Dies ermöglichte Amplifikationen mit einer Kombination aus einem der genspezifischen Primergemische und einem Primer, welcher der an das Poly-T-Ende angehängten Sequenz entsprach. Da höhere Organismen gewebsspezifische Isogene der Untereinheit VIa exprimieren, wurden die PCRs

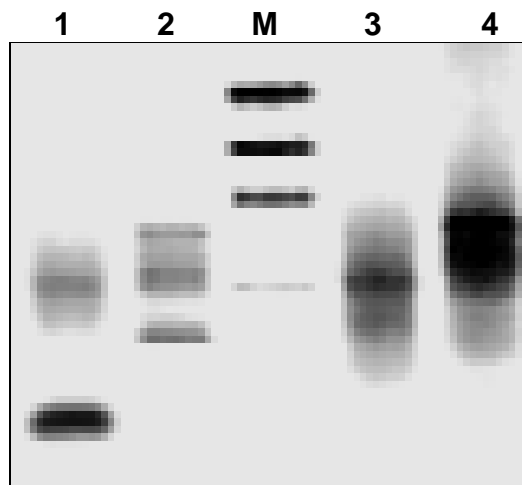
jeweils aus Herz- und Leber-cDNA durchgeführt. Durch die schrittweise Absenkung einer hohen Annealingtemperatur in den ersten PCR-Zyklen konnte gewährleistet werden, daß das genspezifische Primergemisch stringente PCR-Amplifikationen lieferte obwohl dessen Schmelzpunkt wegen der Degeneration schlecht abschätzbar war.

	1	10	20	30																											
Ra-L	S	S	G	A	H	G	-	-	E	E	G	S	A	R	I	W	K	A	L	T	Y	F	V	A	L	P	G	V	G	V	
Bo-L	S	S	G	A	H	G	-	-	E	E	G	S	A	R	M	W	K	A	L	T	L	F	V	A	L	P	G	V	G	V	
Hu-L	S	S	G	A	H	G	-	-	E	E	G	S	A	R	M	W	K	T	L	T	F	F	V	A	L	P	G	V	A	V	
Ra-H	A	S	A	S	K	G	D	H	G	G	A	G	A	N	T	W	R	L	L	T	F	V	L	A	L	P	S	V	A	L	
Bo-H	A	S	A	A	K	G	D	H	G	G	T	G	A	R	T	W	R	F	L	T	F	G	L	A	L	P	S	V	A	L	
Hu-H	A	S	A	A	K	G	G	H	G	G	A	G	A	R	T	W	R	L	L	T	F	V	L	A	L	P	S	V	A	L	
Ca-H									S	Q	G	S	H	E	G	G	A	A	T	W	K										
									#	#	#	#	#	#																	
	<div>Vla+2 5'CARGGIAGYCAYGARGG3'</div>																														
	<div>Vla+1 5'CARGGITC ICAYGARGG3'</div>																														
	40	50	60	70	80	90	100																								
Ra-L	S	M	L	N	V	F	L	K	S	R	H	E	E	H	E	R	P	E	F	V	A	Y	P	H	L	R	I	R	T	K	
Bo-L	S	M	L	N	V	F	M	K	S	H	H	G	E	E	E	R	P	E	F	V	A	Y	P	H	L	R	I	R	S	K	
Hu-L	S	M	L	N	V	Y	L	K	S	H	H	G	E	H	E	R	P	E	F	I	A	Y	P	H	L	R	I	R	T	K	
Ra-H	C	S	L	N	C	W	M	-	-	H	A	G	H	H	E	R	P	E	F	I	P	Y	H	H	L	R	I	R	T	K	
Bo-H	C	T	L	N	S	W	L	-	-	H	S	G	H	R	E	R	P	A	F	I	P	Y	H	H	L	R	I	R	T	K	
Hu-H	C	T	F	N	S	Y	L	-	-	H	S	G	H	R	P	R	P	E	F	R	P	Y	Q	H	L	R	I	R	T	K	
Ca-H										M	Q	A	H	S	H	D	P	P	E	F	V	P	Y	P	H	L	R	I	R	T	K
										#	#	#	#	#	#	#															
	<div>Vla+3 5'CAYGAYCCTCCIGARTTYGT3'</div>																														
	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	
Ra-L	P	F	P	W	G	D	G	N	H	T	L	F	H	N	P	H	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	D	E				
Bo-L	P	F	P	W	G	D	G	N	H	T	L	F	H	N	P	H	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	D	E				
Hu-L	P	F	P	W	G	D	G	N	H	T	L	F	H	N	P	H	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	D	E				
Ra-H	P	F	S	W	G	D	G	N	H	T	L	F	H	N	P	H	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	Q	P				
Bo-H	P	F	S	W	G	D	G	N	H	T	F	F	H	N	P	R	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	K	P				
Hu-H	P	V	P	W	G	D	G	N	H	T	L	F	H	N	S	H	V	N	P	L	P	T	G	Y	E	H	P				

Abbildung 5 Vergleich von bekannten Proteinsequenzen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Vla

Gezeigt ist ein Vergleich der Herz- und Leberisoforamen aus Mensch (Fabrizi et al 1989 und 1992), Rind (Smith et al 1991, Ewart et al 1991) und Ratte (Mell et al 1994) mit den Peptidsequenzierungen des entsprechenden Proteins aus Karpfenherz (Hüttemann et al 1997). Mit Doppelkreuzen sind die Aminosäuren gekennzeichnet, aus denen die darunterstehenden, eingerahmten Primersequenzen Vla+1, Vla+2 und Vla+3 abgeleitet wurden.

Abbildung 6 Amplifikation von 3'cDNA Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa



Ausgehend von 2.5 µg Forellenleber und -herz mRNA wurden mit dem Q₀Q₁dT₁₇-Primer in Reverse Transkriptasereaktionen cDNA-Einzelstränge hergestellt. 1 µl dieses Reaktionsansatzes wurde in einem 50 µl PCR Ansatz mit 30 pmol genspezifischem Forwardprimer, 15 pmol Q₀ Primer und 0.5 µl Vent-DNA Polymerase eingesetzt. Es wurden 30 Zyklen mit 1 min 94° C, 40 sec 60-46° C und 40 sec 72° C durchgeführt. Bei den anfänglichen Zyklen wurde die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigt. Auf ein mit Ethidiumbromid angefärbtes Agarosegel wurden 1 µl DNA-MassLadder™ mit den Fragmentgrößen 2000, 1200, 800 und 400 bp in Spur M und je 20 µl der folgenden PCR

aufgetragen: Spur 1 - PCR aus Forellenleber cDNA mit dem genspezifischen Primer VIa+1 und Q₀. Spur 2 - PCR aus Forellenherz cDNA mit dem genspezifischen Primer VIa+1 und Q₀. Spur 3 - PCR aus Forellenleber cDNA mit dem genspezifischen Primer VIa+2 und Q₀. Spur 4 - PCR aus Forellenherz cDNA mit dem genspezifischen Primer VIa+2 und Q₀.

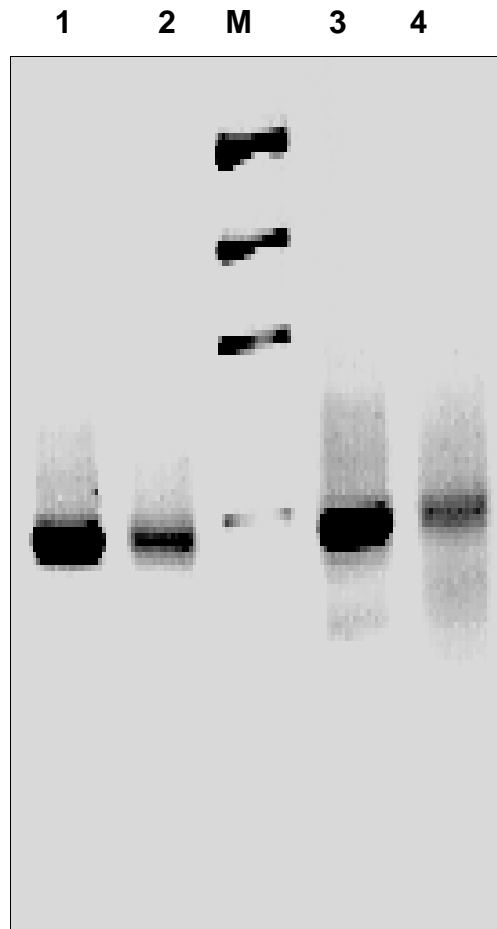
Es wurden zunächst die genspezifischen Primergemische VIa+1 und VIa+2 eingesetzt. Diese codierten einen Abschnitt der Karpfenpeptidteilsequenz, die dem N-Terminus des Proteins am nächsten steht.

Abbildung 6 zeigt PCRs aus Forellenleber und -herz cDNA mit den genspezifischen Primergemischen VIa+1 und VIa+2, welche beide dieselbe Peptidsequenz codieren. Alle PCRs zeigten eine Bande bei ca. 430 bp. Die PCRs aus Herz cDNA zeigten außerdem beide eine Bande bei ca. 480 bp. Die PCRs mit dem Primergemisch VIa+1 zeigten dabei schwächere Bandenintensitäten als jene mit dem VIa+2 Primer. Aus diesen PCRs wurden mit einem inneren Primerpaar aus Q₁ und dem genspezifischen Primer VIa+3 scharfe Banden von ca. 380 bp erzeugt, die etwa den erwarteten Größenunterschied zu den schweren 480 bp Banden der Ausgangs-PCRs von Forellenherz cDNA zeigten (Abbildung 7). Diese Banden wurden mit schwächerer Intensität auch aus den Leber-cDNA-Amplifikationen erhalten, für die vorher kein 480 bp Templatefragments nachgewiesen wurde (vgl. Abbildung 6).

Abbildung 7 Innere PCR aus amplifizierten 3'cDNA-Enden der Untereinheit VIa

Je 1 µl einer 1:20 Verdünnung der cDNA Amplifikationen mit den genspezifischen Forwardprimern VIa+1 und VIa+2 (für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa) wurden in PCRs mit den inneren Primern VIa+3 und Q_i verwendet. Dafür wurden in einem 50 µl Ansatz mit 50 pmol VIa+3, 10 pmol Q_i und 0.5 µl Vent eingesetzt, bei 30 Zyklen mit 1 min 94° C, 40 sec 60-46° C und 40 sec 72° C. Die Annealingtemperatur der ersten Zyklen wurde dabei alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigt. Gezeigt ist ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit 1 µl DNA-MassLadder™ der Fragmentgrößen 2000, 1200, 800, und 400 bp in Spur M und je 20 µl der PCRs

- aus der Forellenherz cDNA mit dem VIa+2 Primer in Spur 1,
- aus der Forellenleber cDNA mit dem VIa+2 Primer in Spur 2,
- aus der Forellenherz cDNA mit dem VIa+1 Primer in Spur 3 und
- aus der Forellenleber cDNA mit dem VIa+1 Primer in Spur 4



7.1.1.2 Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen mit 3'Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

Das 480 bp PCR Produkt aus Forellenherz cDNA mit dem VIa+2 Primer (Abbildung 6) und die 380 bp PCR Produkte des inneren VIa+3/Q_i Primerpaares aus Forellenherz und -leber cDNA Amplifikationen (Abbildung 7) wurden in E.coli Zellen subkloniert. Die Subklone wurden über Verdaus und Sequenzierungen der Plasmide charakterisiert (Abbildung 8 und Abbildung 9). Sechs Klone wurden sequenziert. Dabei wurden zwei Klone mit homologen Sequenzen für die Untereinheit VIa gefunden. Diese stammten aus Klonierungen der Amplifikationen von Herz cDNA, aus dem Produkt der ersten Amplifikation mit dem VIa+2/Q_O Primerpaar und aus dem Produkt der inneren PCR mit dem VIa+3/Q_i Primerpaar.

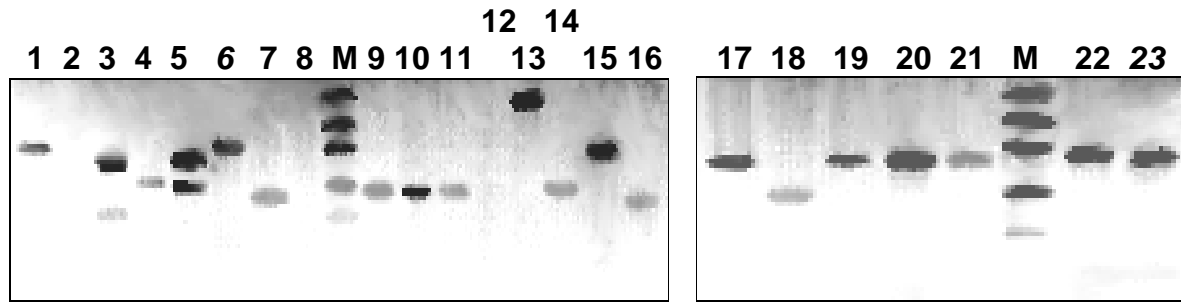


Abbildung 8 Subklonierung der 3'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

Die mit den genspezifischen Forwardprimern für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus den cDNAs von Forellenherz und -leber erhaltenen PCR Fragmente wurden 'blunt end' in SmaI geschnittene PUC18™ Plasmid-DNA ligiert und in E.coli XL1 Blue™ transformiert. Je 1 µl pro 40 µl Plasmidpräparation wurde in einem 10 µl Ansatz mit PvuII verdaut. Dabei wurden außer den einligierten Inserts 330 bp des Vektors ausgeschnitten. Gezeigt sind ethidiumbromidgefärbte Agarosegele mit den verdauten Plasmiden der Subklone von der Klonierung des PCR Fragments mit den Primern VIa+2 und Q₀ aus Forellenherz cDNA in Spur 1-8, - von der Klonierung des PCR Fragments mit den Primern VIa+3 und Q₁ aus Forellenleber cDNA in Spur 9-22 und von der Klonierung des PCR Fragments mit den Primern VIa+3 und Q₁ aus der Forellenherz cDNA in Spur 23-24. Spur M zeigt 1.5 µl DNA-MassLadder™ mit den Fragmentgrößen 2000, 1200, 800, 400 und 200 bp.

Die aus den Klonen abgeleitete Peptidteilsequenz, welche verglichen mit den bekannten Sequenzen anderer Spezies mit 84 Aminosäuren den Großteil der maturierten Sequenz für die Untereinheit VIa darstellt, zeigte etwa gleichgroße Homologien jeweils zu den Herz- und Leberisoformen der Säugetiere (vgl. 7.1.3). Weiterhin wiesen die Klone kleine Sequenzunterschiede untereinander auf, darunter vor allen eine 13 Basendeletion des Klons aus der zweiten (inneren) PCR gegenüber dem Klon mit dem 480 bp Fragment der ersten PCR mit dem VIa+2 Primer. Da dies auf eine sehr hohe Fehlerrate der verwendeten Vent-DNA-Polymerase bei der Vervielfältigung der cDNA-Sequenzen hinwies, wurde von diesem Zeitpunkt an für alle Amplifikationen, die zur Charakterisierung von cDNA-Sequenzen dienen sollten, der 'High Fidelity'-PCR-Kit von Boehringer gewählt. Dieser enthielt eine Kombination der Taq-Polymerase und Pwo-Polymerase, die eine Exonukleasekorrekturfunktion hatten.

Aus den Sequenzen wurden drei zur mRNA komplementäre Primer in 5' Richtung des Gens abgeleitet, die zur Amplifikation des 5'Endes dienen sollten (Abbildung 9). Primer, welche mRNA-Teilsequenzen entsprachen und mit denen in Richtung des

3'Poly-A-Endes cDNA-Zweitstrangsequenzen erzeugt wurden, trugen die Kennzeichnung '+'; Primer, die komplementären mRNA-Teilsequenzen entsprachen und zur Amplifikation von 5'terminalen mRNA-Teilsequenzen dienten, werden im Folgenden mit '-' gekennzeichnet. Die Primer wurden nach ihrer Position auf der cDNA vom 5'Ende der mRNA-Sequenz aus durchnummeriert.

		10	20	30	40	50	60	70
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		CAGGGCAGTCATGAGGGGAGGATCAGCTAGGACGTGGAAGATCCTGTCTGTTTGTGTTGGCCCTACCTGGTG						
		-----Vla+2----->						
		Q	G	S	H	E	G	G
		S	A	R	T	W	K	I
		L	S	F	V	L	A	L
		P	G					
		80	90	100	110	120	130	140
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		TGGCCGTCTGCATCGCCAACGCCTACATGAAGATGCAACCAGACTCCAATGACCCCCCTAAGTTTGTGGC						
		:::::::::::: ::::::::::						
Klon 23		-----CATGACCCCCCTGAGTTTGTGGC						
		-----Vla+3----->						
		V	A	V	C	I	A	N
		A	Y	M	K	M	Q	P
		D	S	N	D	P	P	E
		F	V					
		150	160	170	180	190	200	210
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		CTACTCACACCTTCGCATCCGGCCCAAGAAATGGCCCTGGGGTGATGGGAACCACTCTCTCTTCCACAAC						
		:::::::::::: :: :::::::::: : :::::::::: ::<-----Vla-4-----						
Klon 23		CTACTCACACCTTCGCATCTGGACCAAGAAATGGGCTTGGGGTGATGGTAACCACTCTCTCTTCCACAAC						
		A	Y	S	H	L	R	I
		R	P	K	K	W	P	W
		G	D	G	N	H	S	L
		F	H	N				
		220	230	240	250	260	270	280
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		CCTCATGAAAATGCTCTTCTTGAGGGTTATGAGGGGCCCCGCCACTAAGGAAACCTAACTCTATGCTGAT						
		-----> :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::						
Klon 23		CCTCATGAAAATGTTCTTCTTGAGGGCTATGAGGGGCCCCGTCACTAAGGAAACCTAACTCTATGCTGAT						
		P	H	E	N	A	L	P
		E	G	Y	E	G	P	R
		H	-					
		290	300	310	320	330	340	350
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		CATCCACCTTCCCTGATTACTACGTCCTGAATA-----GCTCTAATGAACCTGGCCTTATGC						
		::<-----Vla-5-----: :::::::::: :::::::::: ::::::::::						
Klon 23		CATCCACCTTCCCTGATTACTACATCCTGAATATCTGTAATCTATAGCTCTAATGAACCTGGCATTATAC						
		360	370	380	390	400	410	420
		*	*	*	*	*	*	*
Klon 6		TACTGACCAAGGGGCCAATTAGCAACACTACTGACTGTGGTGCTCCCAGTCAGATAGAAATAAAAAATAT						
		::::::::::::<-----Vla-6----- :::::::::: :::::::::: ::::::::::						
Klon 23		TACTGACCAAGGGGCCAATTAGCAACACTATTGACTGTGGTGCTCCCAGTCAGATAGAAATAAAAAATAT						
		430	440					
		*	*					
Klon 6		AAAACCTTTTACTGTAATCAC(A) ₅₀						
		:::: ::::::::::::::						
Klon 23		AAAAGTTTTTACTGTAATCAC(A) ₅₁						

Abbildung 9 Vergleich der cDNA Sequenzen zweier 3'RACE-Klone

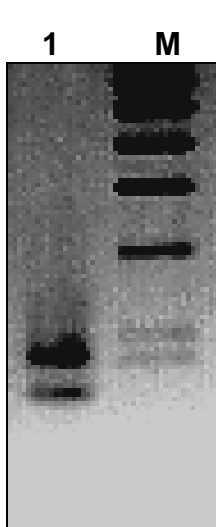
Fettgedruckt sind die Primerenden der gezeigten PCR-Inserts von den Klonen 6 und 23 (vgl. Abbildung 8), sowie die Sequenzen aus denen die 5'RACE Primer Vla-6, Vla-5 und Vla-4 abgeleitet wurden. Mit '-' gekennzeichnete Primer sind komplementär zu der abgebildeten Sequenz. Pfeile zeigen die 5'->3'-Richtung der Primer an. Weiterhin gezeigt ist die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz.

7.1.2 Isolierung und Charakterisierung von 5'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forellenleber

7.1.2.1 Amplifikation von cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa in 5'Richtung

In Abbildung 9 sind die Positionen der Primer dargestellt, die zur Amplifikation des 5'cDNA-Endes der Untereinheit VIa eingesetzt wurden. Der cDNA-Erststrang wurde mit dem Primer VIa-6 in einer Reverse Transkriptasereaktion erzeugt und anschließend polyadenyliert. Das angefügte Poly-A-Ende wurde zur Herstellung des cDNA-Zweitstranges mit dem Poly-T-Primer genutzt, welcher zusätzliche 5'terminale Primersequenzen Q_O und Q_I enthielt und bereits für die Vervielfältigung von 3'cDNA-Enden eingesetzt wurde (siehe 7.1.1).

Abbildung 10 5'RACE PCR für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

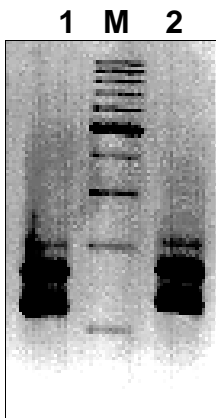


Aus 10 µg einer gesamt-RNA-Präparation aus Forellenleber wurde mit Reverser Transkriptase und dem VIa-6 Primer cDNA hergestellt. Nach Abbau der RNA-Matrize mit RNaseH und Abtrennung von überschüssigen Primern und Nucleotiden mit amicon™ Filtern wurden die cDNA-Einzelstränge mit Terminaler Desoxynucleotidyltransferase und dATP polyadenyliert. Diese polyadenylierten 5'-cDNA-Enden wurden als Templates für einen 50 µl PCR-Ansatz mit 2 pmol Q_OQ_IdT₁₇-, 20 pmol Q_O- und 20 pmol des inneren VIa-5 Primers eingesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei 98° C denaturiert und 2 min bei 48° C inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 µl Taq/Pwo DNA-Polymerase wurde in 40 min bei 72° C der cDNA Zweitstrang erzeugt. Es folgte eine PCR, bei der die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C von 58 auf 48° C abgesenkt wurde. 30 Zyklen wurden durchgeführt mit 1 min 94° C Denaturierung, 30 sec 58-48° C Annealing und 1 min Elongation bei 72° C. Gezeigt ist ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit 20 µl der PCR in Spur 1 und DNA Fragmenten von 1 µl BioLadder™ mit den Größen 80, 100, 200, 300, 400, 500 und 600 bp in Spur M.

Eine PCR aus Forellenleber cDNA mit dem inneren genspezifischen Primer VIa-5 zeigte nur Produkte, die viel zu kurz waren, um als die gesuchten 5'cDNA-Enden in Frage zu kommen (Abbildung 10). Daraufhin wurden aus dieser Reaktion Reamplifikationen mit dem inneren Primer Q_I in Kombination mit dem VIa-5 Primer bzw. dem weiter in 5'Richtung liegenden VIa-4 Primer durchgeführt. Abbildung 11 zeigt, daß aus dieser PCR ebenfalls vor allem zu kurze Produkte erhalten wurden. Weiterhin waren mit sehr schwacher Intensität Amplifikationsprodukte im

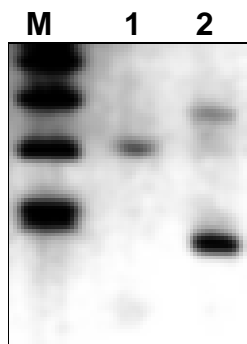
Größenbereich zwischen ca. 450 und 200 bp zu sehen. Zur Überprüfung, ob diese PCR-Produkte die gesuchten 5'-cDNA-Enden amplifiziert hatten, wurde die erste PCR mit dem V1a-5/Q₀ Primerpaar für eine Reamplifikation mit dem genspezifischen Primergemisch V1a+2 eingesetzt, mit dem bereits das 3'-cDNA-Ende isoliert werden konnte. Als Gegenprimer dienten die genspezifischen Primer in 5'-Richtung V1a-5 bzw. V1a-4. Aus der Sequenzinformation über das 3'-Ende, die Aufschluß über die Position dieser Primer gibt, mußten für diese PCR-Produkte von ca. 210 und ca. 300 bp erwartet werden (vgl. Abbildung 9). Der Nachweis dieser Produkte aus den entsprechenden PCR-Produkten ist in Abbildung 12 gezeigt.

Abbildung 11 Innere PCR aus den 5'-RACE -Produkten mit den Primern für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit V1a



1 µl einer 1:20 Verdünnung der PCR mit dem Primerpaar V1a-5 und Q₀ aus Leber cDNA wurde in einem 50 µl PCR Ansatz mit 10 pmol Q₀- sowie 10 pmol genspezifischem Primer und 0.5 µl Taq/Pwo DNA-Polymerase amplifiziert. Die Annealingtemperatur wurde nach je zwei Zyklen um 2° C bis auf 50° C erniedrigt. Es wurde in 30 Zyklen amplifiziert mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec Annealing bei 60-50° C und 1 min Elongation bei 72° C. Auf ein ethidiumbromidangefärbtes Agarosegel wurden in Spur 1 20 µl einer PCR mit dem genspezifischen Primer V1a-4 und 20 µl einer PCR mit dem genspezifischen Primer V1a-5 in Spur 2 aufgetragen sowie 0.5 µl BioLadder™ mit den Fragmentgrößen 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 und 1000 bp in Spur M. Die dicke Bande des Markers entspricht 500 bp.

Abbildung 12 Kontroll-PCRs aus der 5'-RACE PCR für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit V1a

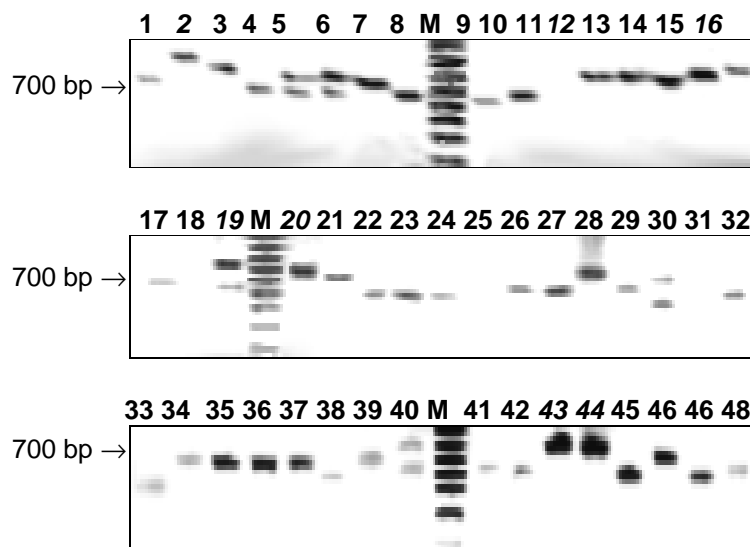


Aus je 1 µl einer 1:20 verdünnten PCR-Amplifikation von Leber cDNA in 5'-Richtung wurden in 50 µl PCR Ansätzen mit Vent-DNA-Polymerase Fragmente mit dem degenerierten genspezifischen V1a+2-Primergemisch dem Primer V1a-4 (Spur 1) bzw. dem Primer V1a-5 (Spur 2) erzeugt. Es wurden 30 PCR-Zyklen gefahren mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec Annealing bei 60-50° C und 40sec Elongation bei 72° C, wobei die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C von 60 bis auf 50 ° C abgesenkt wurde. In Spur M sind Fragmente von 0.5 µl BioLadder™ mit den Größen 100, 200, 300 und 400 bp zu sehen; in Spur 1 und 2 wurden je 20 µl einer PCR auf das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel aufgetragen.

7.1.2.2 Isolierung und Charakterisierung von 5'RACE-Klonen der Untereinheit VIa

Von der inneren PCR mit den Primern VIa-4 und Q_I aus amplifizierten Leber-5'cDNA-Enden wurden die Produkte subkloniert, die auf einem Agarosegel im Größenbereich zwischen 300 und 450 bp zu sehen waren (siehe Abbildung 11). 46 Subklone wurden durch Plasmidverdaus nach Insertgröße charakterisiert (Abbildung 13). Zur weiteren Kontrolle auf cDNA Inserts der Untereinheit VIa wurden die Plasmide mit den größten Inserts in PCRs mit Primerkombinationen aus dem VIa-4 Primer und einem der genspezifischen Primergemische VIa+2 bzw. VIa+3 untersucht (Abbildung 14). Auf diese Weise wurden 9 Klone selektiert, die in Kontroll PCRs mit den genspezifischen Primerpaaren VIa+3/VIa-4 bzw. VIa+2/VIa-4 Fragmente mit den erwarteten Größen von ca. 210 bzw. 100 bp lieferten (vgl. Abbildung 10).

Abbildung 13 Charakterisierung von Subklonen der 5'RACE-Produkte mit dem VIa-4-Primer



mit den Inserts jeweils 450 bp der Vektor-DNA mitausgeschnitten. Als Marker wurden je 0.5 µl BioLadder™ mit Fragmentgrößen von 100 bis 1000 bp aufgetragen (M).

Die innere PCR zur Amplifikation von 5'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa mit dem Primerpaar VIa-4 und Q_I wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem im Größenbereich von 300 bis 450 bp DNA eluiert wurde. Es wurde eine 'blunt end' Ligation in EcoRV geschnittene pBlueskript™SK(+) Plasmid-DNA und eine Transformation in E.coli XL1 Blue™ durchgeführt. Zu sehen sind PvuII Verdaus aus je 1 µl einer 80 µl TENS Plasmidpräparation von 46 Klonen auf ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen. Dabei wurden



Abbildung 14 Kontroll PCR aus den Subklonen von PCR Produkten aus Forellen-leber cDNA mit den genspezifischen Primerpaaren Vla-4/Vla+3 und Vla-4/Vla+2

A), B) Je 1 µl einer 1:40 Verdünnung der Plasmidpräparation von einem Klon (vgl. Abbildung 13) wurde in einer 50 µl PCR mit 50 pmol Vla+3- und 10 pmol Vla-4-Primer und 0.2 µl Vent DNA-Polymerase eingesetzt. Es wurde in 30 Zyklen amplifiziert mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec Annealing bei 58-46° C und 40sec Elongation bei 72° C, wobei die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C von 58 bis auf 46° C erniedrigt wurde. Gezeigt sind ethidiumbromidgefärbte Agarosegele mit je 20 µl der PCR aus einem Klon bzw. 0.5 µl BioLadder™ mit Fragmenten von 100, 200 und 300 bp.

Die Plasmide, welche positive PCR-Signale zeigten, dienten für PCRs mit denselben Bedingungen und 50 pmol Vla+2- sowie 10 pmol Vla-4-Primer, die auf dem unter C) gezeigten Agarosegel zu sehen sind.

Plasmidsequenzierungen ergaben, daß acht dieser Klone cDNA-Sequenzen für die Untereinheit Vla enthielten, die aber nicht weit genug in 5'Richtung reichten. Nur die zwei Klone, die in der Kontroll PCR mit dem Vla+2 Primer die stärksten Banden zeigten (Klone 2 und 16 in Abbildung 14) hatten cDNA-Inserts, die mit der Sequenz dieses Primergemischs überlappten, und unterschieden sich in der Länge der cDNA Sequenz um eine Base. Die anderen Klone, aus denen schwache Banden in der erwarteten Größe amplifiziert wurden, hatten kürzere cDNA-Enden ohne Bindungsstelle für den Vla+2 Primer.

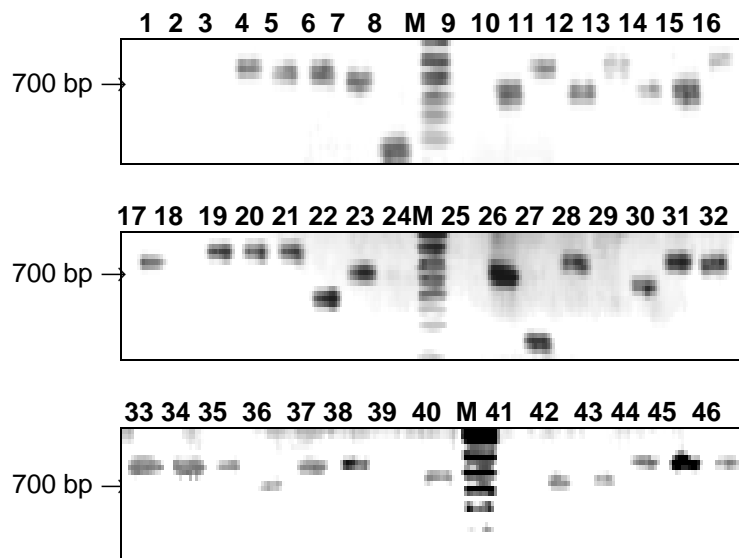


Abbildung 15 Subklone der 5'RACE-Produkte mit dem Vla-4-Primer

Die innere PCR von 5'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Vla mit dem genspezifischen Primer Vla-4 und dem Q_i Primer wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 11). Aus dem Größenbereich zwischen 400 und 600 bp wurde DNA eluiert und 'blunt end' in EcoRV geschnittene pBlueskript™SK(+) Plasmid-DNA ligiert. Aus einer Transformation in E.coli XL1 Blue™ Zellen wurden von 46 Klonen Plasmide präpariert. Zu sehen sind PvuII

TENS Plasmidpräparationen auf mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegelen. Die gezeigten Restriktionsfragmente enthalten jeweils die einklonierten Inserts und 450 bp der Vektor-DNA. Als Marker wurden je 0.5 µl BioLadder™ mit Fragmentgrößen von 100 bis 1000 bp aufgetragen (M).

In einer weiteren Subklonierung wurde der Größenbereich von 400 bis 600 bp aus der cDNA-Amplifikation mit dem Vla-4 und dem Q_i-Primer aus einem Agarosegel eluiert und kloniert. 15 von 46 Klonen wurden wie beschrieben durch Verdaus und Kontroll PCRs mit den Primerpaaren Vla+2/Vla-4 und Vla+3/Vla-4 selektiert (Abbildung 15 und Abbildung 16).

Von 13 dieser Klone wurde Plasmid-DNA sequenziert. Alle 13 Klone hatten bis auf die Länge der Poly-A-Enden Inserts mit identischer Sequenz und eine cDNA-Länge, die mit dem längsten, aus der vorher durchgeführten Subklonierung erhaltenen cDNA-Insert übereinstimmten (Abbildung 17).

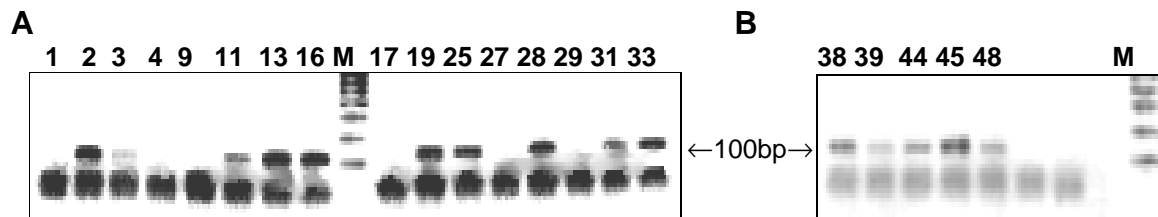
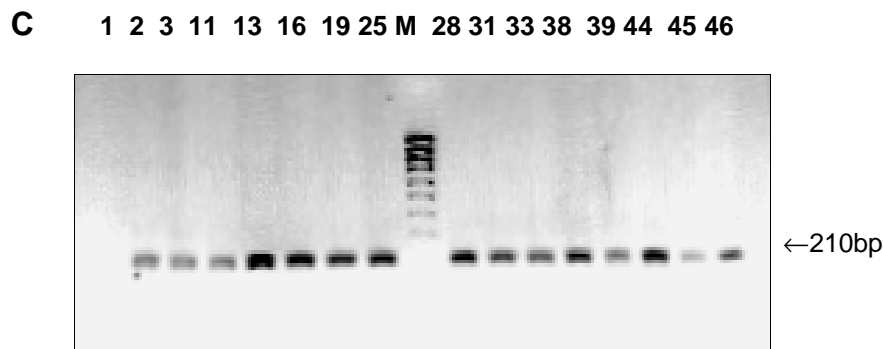


Abbildung 16 Kontroll PCR für die Subklonierung von PCR amplifizierten 5'cDNA-Enden mit dem Vla-4-Primer aus Forellenleber.

A), B) Je 1 μ l einer 1:40 Verdünnung der Plasmidpräparation verschiedener Klone (vgl. Abbildung 15) wurde in einer 25 μ l PCR mit 25 pmol Vla+3- und 5 pmol Vla-4-Primer und 0.15 μ l Vent DNA-Polymerase eingesetzt. Es wurde in 30 Zyklen amplifiziert mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec bei einer Annealingtemperatur, die alle zwei Zyklen um 2° C von 58 bis auf 46° C erniedrigt wurde, und 40sec Elongation bei 72° C. Oben sind ethidiumbromidgefärbte Agarosegele mit je 20 μ l der PCR aus einem Klon bzw. 0.5 μ l BioLadder™ (Spur M) mit Fragmenten von 100 - 1000 bp abgebildet.

C) Aus den Plasmiden, welche positive PCR-Signale zeigten, wurden unter denselben Bedingungen PCRs mit genspezifischen Primern Vla+2- und Vla-4 durchgeführt, die auf dem unten abgebildeten Agarosegel zu gezeigt sind.



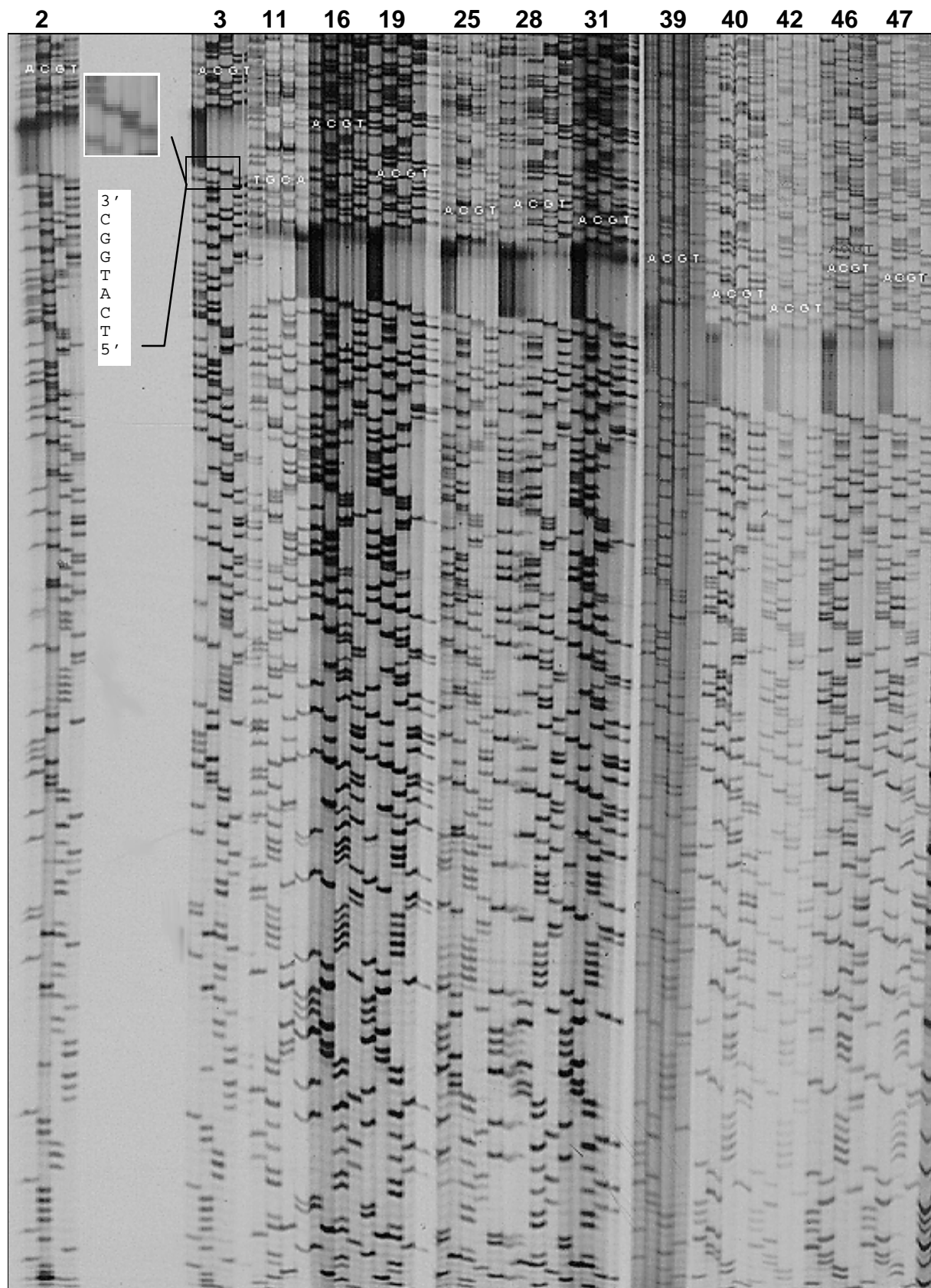


Abbildung 17 Sequenzierung von Subklonen amplifizierter 5'cDNA-Enden

Gezeigt ist ein Röntgenfilm von Sequenzierungen mit dem KS-Vektorprimer der pBluescript™-Plasmide aus 13 cDNA Klonen. Die Sequenzen sind bis auf die Länge der Poly-A-Abschnitte identisch. Hervorgehoben ist die Sequenz der cDNA-Enden dieser Klone.

7.1.2.3 Verlängerung von 5'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa durch eine Reverse Transkriptasereaktion mit zwei Denaturierungsschritten

Da sich unter Standardbedingungen nur 5'cDNA-Enden erzeugen ließen, die an einer bestimmten Position endeten, wurde eine sehr stabile Sekundärstruktur der Untereinheit VIa mRNA vermutet. Um dieses Hindernis bei der Transkription von RNA in cDNA zu überwinden, wurde die RNA vor der Transkription länger und bei höherer Temperatur denaturiert. Die Reverse Transkriptasereaktion wurde mit dem zuvor benutzten VIa-6 Primer zwischen 50 und 42° C anstatt bei 37° C ausgeführt. Außerdem wurde zwischendurch ein Denaturierungsschritt bei 80° C eingeführt, nach welchem die Reaktion mit frischem Enzym fortgesetzt wurde. Wie vorher wurde der cDNA-Zweitstrang hergestellt und eine PCR mit dem VIa-5 - und dem Q₀ Primer durchgeführt, von der zunächst keine Fragmente in der gewünschten Größe zu sehen waren (Abbildung 18). Eine PCR mit den inneren Primern VIa-4 und Q₁ ('nested' PCR) erzeugte dagegen mit hoher Intensität Produkte, die mit 320 und 380 bp längere 5'cDNA-Enden anzeigten als bisher erhalten wurden (Abbildung 19).



Abbildung 18 Amplifikation von 5'cDNA-Enden mit veränderten RNA-Transkriptionsbedingungen

Aus 7.5 µg einer gesamt-RNA-Präparation aus Forellenleber wurden mit 20 pmol des genspezifischen Primers VIa-6 in einem Reverse Transkriptase Reaktionsansatz eingesetzt. der Ansatz wurde (ohne Reverse Transkriptase) 5 min bei 90° C denaturiert und 2min auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 1.9 µl Reverser Transkriptase wurde innerhalb von 90 min ein Temperaturgradient von 50 bis 42° C abgefahren. Anschließend wurde der Ansatz 6 min auf 80° C erhitzt und nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis mit einem weiteren µl Reverse Transkriptase versetzt. Danach wurde eine Stunde bei 42° C, 7min bei 50° C und zur Inaktivierung des Enzyms 15min bei 72° C inkubiert. Nach Abbau der RNA-Matritze mit RNaseH und Abtrennung der überschüssigen Primer und Nukleotide mit amicon™ Filtern wurden die cDNA Stränge mit dATP und Terminaler Nukleotidtransferase polyadenyliert. Die cDNA Zweitstränge wurden aus 1 µl der auf 400 µl aufgefüllten Reaktion in einem 45 µl PCR-Ansatz mit 2 pmol Q₀Q₁dT₁₇-Primer erzeugt. Dazu folgten 5 min Denaturierung bei 98° C, 2min Annealing bei 48° C und nach Zugabe von 0.5µl Taq/Pwo DNA-Polymerase ein Elongationsschritt von 40 min bei 72° C. Nach Zugabe von 25pmol VIa-5-Primer und 25 pmol Q₀-Primer in einem Volumen von 5 µl wurden 30 Zyklen einer Touch Down PCR durchgeführt mit 1 min Denaturierung bei 94° C und 30sec bei einer Annealingtemperatur, die alle zwei Zyklen um 2° C von 60 auf 54° C abgesenkt wurde, und 1 min Elongation bei 72° C. Abgebildet ist ein ethidiumbromidangefärbtes Agarosegel mit 20 µl der PCR in Spur 1 und 0.5 µl BioLadder™ mit Fragmentgrößen von 200 bis 1000 bp im Abstand von je 100 bp in Spur M.

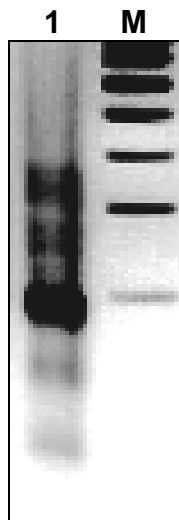


Abbildung 19 Innere PCR zur Reamplifikation von 5'cDNA-Enden

1 μ l einer 1:20 Verdünnung der PCR mit dem Primerpaar Vla-5 /Q₀ aus der 5'RACE von Forellenleber wurde DNA in einer Touch Down PCR mit den inneren Primern Vla-4 und Q₁ sowie 0.5 μ l Taq/Pwo-DNA-Polymerase vermehrt. Nach 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94° C und 30 sec Annealing bei einer alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigten Annealingtemperatur zwischen 60 und 50° C, sowie 1 min Elongation bei 72° C wurde ein 100 μ l PCR Ansatz mit Ethanol gefällt und auf ein 2%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen (Spur 1). Spur M zeigt 0.5 μ l BioLadder™ mit den Fragmentgrößen 200, 300, 400, 500, 600 und 700 bp. Zusätzlich eingerahmt ist der Bereich, von PCR-Fragmenten, der zur Subklonierung aus dem Gel eluiert wurde.

7.1.2.4 Isolierung und Charakterisierung eines Klons mit dem 5'cDNA-Ende der Untereinheit Vla

Von der PCR mit dem inneren Primerpaar Vla-4/Q₁ wurden die Produkte oberhalb der Bande von 380 bp in einem Bereich von ca. 390 bis 480 bp (vgl. Abbildung 19) aus einem Agarosegel eluiert und subkloniert. Um eine bessere Abtrennung kurzer Fragmente zu erreichen, wurde dazu ein höherprozentiges Agarosegel verwendet. Die Plasmide von 46 Klonen wurden durch Verdaus charakterisiert. Etwa die Hälfte der Klone zeigte dabei Insertgrößen, die mit ca. 210 bp denen der vorher charakterisierten 14 identischen 5'cDNA-Enden etwa entsprachen (Abbildung 20). Die Plasmide mit den größten Inserts dienten für Kontroll PCRs mit Primerkombinationen aus dem Vla-4 Primer und dem Vla+2 bzw. dem Vla+3 Primer. Das Plasmid eines Klones ergab mit beiden Primerkombinationen intensive Banden der erwarteten Größen (Klon31 in Abbildung 21). Die Plasmidsequenzierung dieses Klons von beiden Seiten lieferte die vollständige Information für das 5'cDNA Ende der Untereinheit Vla (Abbildung 22).

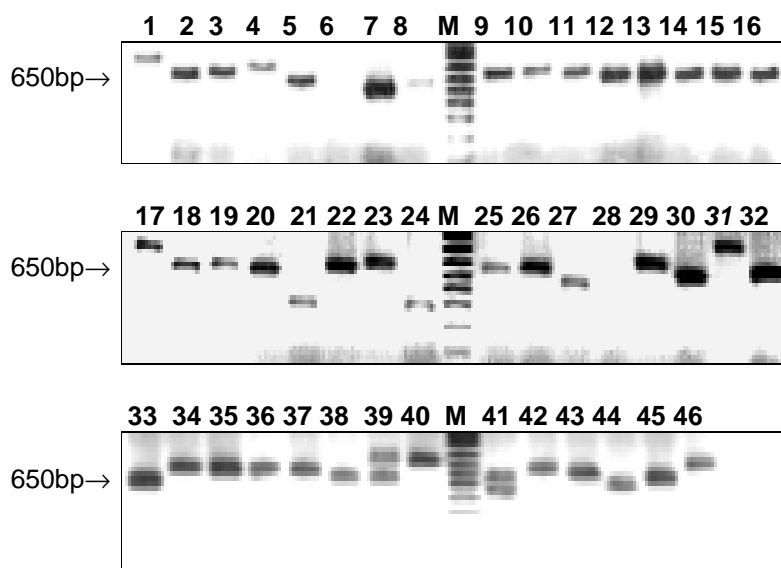


Abbildung 20 Subklone amplifizierter cDNA-Enden für die Untereinheit VIa

Die PCR-Produkte aus der 5'RACE von Forellenleber RNA mit dem genspezifischen Primer VIa-4- und dem Q₁-Primer wurden im Längenbereich von 390 bis 480 bp aus einem Agarosegel eluiert und in EcoRV geschnittene pBlueskript™SK(+) Vektor DNA ligiert. Von 46 Klonen einer Transformation in E.coli XL1 Blue™ wurden Plasmidpräparationen und PvuII Verdaus aus je 1 µl von 80 µl

einer Präparation durchgeführt. Gezeigt sind mit Ethidiumbromid angefärbte Agarosegele der PvuII Reaktionen, bei denen die einligierten Inserts zusammen mit 450 bp der Vektor DNA ausgeschnitten wurden. Die Markerspuren (M) zeigen Fragmente von 100 bis 1000 bp mit Größenunterschieden von je 100 bp. 24 Plasmide (2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 23, 25, 26, 29, 34, 35, 36, 37, 43 und 46) zeigen PvuII Fragmente von ca. 660 bp, was auf Insertlängen von ca. 210 bp schließen lässt.

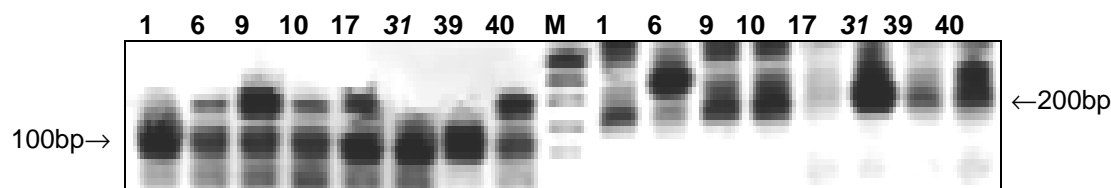


Abbildung 21 Kontroll-PCR von Subklonen mit amplifizierten 5'cDNA-Enden

Aus je 1 µl einer 1:40 Verdünnung der Plasmidpräparationen von einigen Subklonen (vgl. Abbildung 20) der PCR Produkte mit den Primern VIa-4 und Q₁ (aus der 5'RACE von Forellenleber RNA) wurde in 25 µl PCR Ansätzen mit 30 Zyklen DNA vermehrt - bei 1 min Denaturierzeit mit 94° C und 30sec Annealing bei einer alle zwei Zyklen um 2° C reduzierten Temperatur zwischen 60 und 48° C sowie 40sec Elongation bei 72° C. Es wurden jeweils 5 pmol Q₁ und 25 pmol VIa-4Primer eingesetzt und 20 µl jeder PCR auf ein Agarosegel mit Ethiumbromid aufgetragen. Die Markerspur (M) zeigt Fragmente von 100, 200, 300, 400 und 500 bp aus 0.5 µl BioLadder™.

[illegible]

Abbildung 22 Vergleich der Sequenzen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Fischen

Dargestellt sind die cDNA- und abgeleiteten Peptidsequenzen von Karpfen (Hüttemann et al 1997) und Forelle. Die ersten 289 Basen der Forellen-cDNA wurden aus den Klonen mit amplifizierten 5'cDNA-Enden ermittelt, die restlichen aus den beiden Klonen mit amplifizierten 3'cDNA-Enden. Aus Vergleichen mit bekannten homologen Säugetiersequenzen wurde auf den Anfang der fettgedruckten maturierten Proteinsequenz geschlossen. Die Polyadenylierungssignale sind unterstrichen.

7.1.3 Analyse der cDNA Sequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa aus Forelle

7.1.3.1 Sequenzvergleiche mit homologen Sequenzen der Untereinheit VIa

Abbildung 22 zeigt die cDNA und die daraus abgeleitete Peptidsequenz der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa der Forelle im Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen vom Karpfen, die von Maik Hüttemann gefunden wurde (Hüttemann et al 1997). Die Sequenzen zeigen auf Peptidebene eine hohe Homologie von 82%. Die Homologie auf Nukleotidebene ist in den translatierten Bereichen besonders hoch und liegt insgesamt bei 62%.

Abbildung 23 zeigt einen Aminosäurevergleich der beiden Fischsequenzen der Untereinheit VIa mit den bekannten Sequenzen der Herz- und Leberisoformen der Säugetiere Ratte (Mell et al 1994), Rind (Smith et al 1991 und Ewart et al 1991) und Mensch (Fabrizi et al 1989 und 1992). Die Sequenzen der Fische Forelle und Karpfen zeigen Homologien sowohl zu den Leber- als auch den Herzformen der Säugetiere. Die Precursorsequenzen sind etwas länger als die der homologen Herzformen und wesentlich kürzer als die der Leberformen. Die Sequenzhomologien zwischen den Fischproteinen der Untereinheit VIa und den entsprechenden Isoformen von Mensch, Rind und Ratte sind in Tabelle 3 angegeben. Es konnten etwa gleiche Verwandtschaften zwischen Herz- und Leberformen der Säugetiere untereinander wie zwischen den Fischpeptiden und den Isoformen der Säugetiere gefunden werden.

	-26	-20	-10	-1
			+	*
Ra-L	M A S A V L S A S R V S G L L G R A L P R V G R P M			
Hu-L	M A S A V L S A S R V S R P L G R A L P G L R R P M			
Forelle			M A S P A S M A A R R V L	
Karpfen			<u>M A M</u> S P A <u>A T V R R R A L</u>	
Ra-H			M A L P L K V L S R S M	
Bo-H			M A L P L K S L S R G L	
				*
		10	20	30
	§	+	+	*
Ra-L	S S G A H G - - E E G S A R I W K A L T Y F V A L P G V G V			
Bo-L	S S G A H G - - E E G S A R M W K A L T L F V A L P G V G V			
Hu-L	S S G A H G - - E E G S A R M W K T L T F F V A L P G V A V			
Forelle	<u>S</u> A A S <u>H A G</u> H E G G S A R T W K I L S F V L A L P G V A V			
Karpfen	<u>A</u> A A S <u>Q G S</u> H E G G - A R T W K I L S F V L A L P G V <u>G</u> V			
Ra-H	A S A S K G D H G G A G A N T W R L L T F V L A L P S V A L			
Bo-H	A S A A K G D H G G T G A R T W R F L T F G L A L P S V A L			
Hu-H	A S A A K G G H G G A G A R T W R L L T F V L A L P S V A L			
	§ +	+	+	*
		40	50	60
		*	+	§
Ra-L	S M L N V F L K S R H E E H E R P E F V A Y P H L R I R T K			
Bo-L	S M L N V F M K S H H G E E E R P E F V A Y P H L R I R S K			
Hu-L	S M L N V Y L K S H H G E H E R P E F I A Y P H L R I R T K			
Forelle	C <u>I</u> A N A Y M K M Q <u>Q</u> H S H <u>E</u> P P E F V A Y <u>S</u> H L R I R T K			
Karpfen	C <u>M</u> A N A Y M K M Q <u>A</u> H S H <u>D</u> P P E F V <u>P</u> Y <u>P</u> H L R I R T K			
Ra-H	C <u>S</u> L N C W M - - H A G H H E R P E F I P Y H H L R I R T K			
Bo-H	C T L N S W L - - H S G H R E R P A F I P Y H H L R I R T K			
Hu-H	C T F N S Y L - - H S G H R P R P E F R P Y Q H L R I R T K			
	+	*	§	*
		70	80	
		*	*	*
Ra-L	P F P W G D G N H T L F H N P H V N P L P T G Y E D E			
Bo-L	P F P W G D G N H T L F H N P H V N P L P T G Y E D E			
Hu-L	P F P W G D G N H T L F H N P H V N P L P T G Y E D E			
Forelle	<u>K</u> W P W G D G N H S L F H N <u>P</u> H <u>E</u> N A L P <u>E</u> G Y E G P <u>R</u> H			
Karpfen	<u>P</u> W P W G D G N H S L F H N <u>A</u> H <u>I</u> N A L P <u>T</u> G Y E G P <u>H</u> H			
Ra-H	P F S W G D G N H T L F H N P H V N P L P T G Y E Q P			
Bo-H	P F S W G D G N H T F F H N P R V N P L P T G Y E K P			
Hu-H	P V P W G D G N H T L F H N S H V N P L P T G Y E H P			
		*	*	*

Abbildung 23 Vergleich der Fischproteinsequenzen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa mit den entsprechenden Isoformsequenzen aus Säugetieren

Dargestellt ist die aus der cDNA ermittelte Peptidsequenz der Forelle sowie des Karpfen (Hüttemann et al 1997) und die Isozymsequenzen von Ratte [Ra] (Mell et al 1994), Rind [Bo] (Smith et al 1991 und Ewart et al 1991) und Mensch [Hu] (Fabrizi et al 1989 und 1992). Die Leberform ist jeweils mit (L) und die Herzform mit (H) bezeichnet. Zwischen Karpfen und Forelle verschiedene Aminosäuren sind unterstrichen. Sterne kennzeichnen Aminosäuren, die in allen verglichenen Sequenzen gleich sind. Unterschiede zwischen konservierten Aminosäuren von Säugetieren zu den Fischsequenzen sind mit § markiert. Mit '+' sind Stellen markiert, an denen die Fischsequenzen mit Aminosäuren übereinstimmen, die nur in einer der beiden Säugetierisoformen konserviert sind. Dünn gedruckt ist der Sequenzabschnitt des Rinderherzpeptids, der als transmembrane α -Helix identifiziert wurde (Tsukihara et al 1996).

	HuL	BoL	RaL	Trout	Carp	HuH	BoH	RaH
HuL	100	91	92	60	58	61	61	61
BoL		100	90	60	56	55	55	58
RaL			100	60	56	55	55	55
Trout				100	82	57	46	56
Carp					100	58	53	60
HuH						100	80	80
BoH							100	80
RaH								100

Tabelle 3 Homologievergleich von Fischpeptiden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa mit entsprechenden Säugetierisozeptiden

Die Tabelle zeigt Prozentangaben der Homologien zwischen den maturierten Peptidsequenzen (siehe Abbildung 23) von Forelle (Trout) und Karpfen (Carp) sowie den Leberformen von Mensch (HuL), Rind (BoL) und Ratte (RaL) und den Herzformen von Mensch (HuH), Rind (BoH) und Ratte (RaH).

7.1.3.2 Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

Nach einer Methode von Felsenstein (1981) wurde aus verschiedenen translatierten Nukleotidsequenzen der Untereinheit VIa ein phylogenetischer Stammbaum berechnet. Dafür wurden die Forellensequenz und die bekannten Sequenzen von Hefe (Taanman, Capaldi 1992), Karpfen (Hüttemann et al 1997), Rinderherz (Smith et al 1991), Rattenherz (Mell et al 1994), Rattenleber (Mell et al 1994) und menschlicher Leber (Arnaudo et al 1992) verwendet.

Abbildung 24 zeigt jeweils gemeinsame Wurzeln für die Leberformen der Säugetiere, für die Herzformen der Säugetiere und für die Fischsequenzen. Die Fischsequenzen zeigen eine gemeinsame Wurzel mit den Herzformen der Säugetiere. Der zeitliche Abstand dieser Wurzel zur Differenzierung des Peptids in Isoformen liegt allerdings im Bereich der Fehlergrenzen so daß ebenso eine gemeinsame entwicklungsgeschichtliche Wurzel für Herz-, Leber- und Fischformen der Untereinheit VIa angenommen werden kann. Es ist zu beachten, daß die Fehlerabweichungen der Zeitangaben größer werden, je weiter diese zurückreichen.

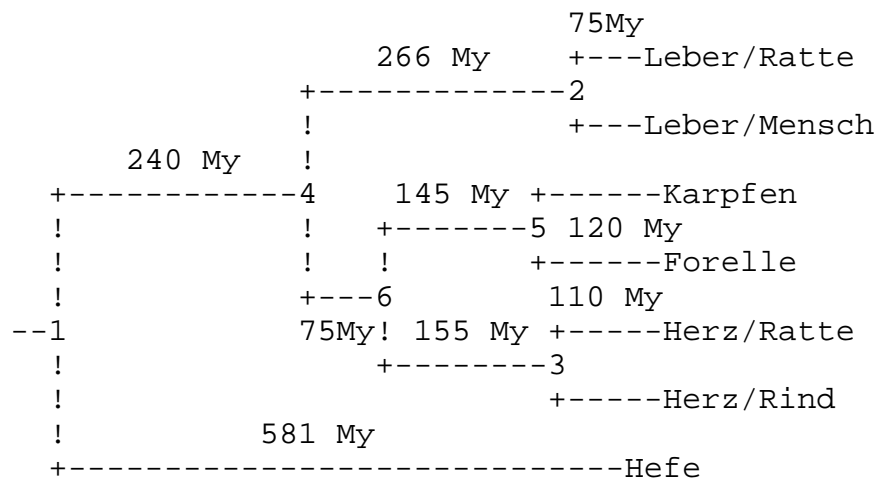


Abbildung 24 Phylogenetischer Stammbaum für die Untereinheit VIa

Nach einer Methode von Felsenstein (Felsenstein 1981) wurde aus verschiedenen Nukleotidsequenzen für maturierte Proteine der Untereinheit VIa ein phylogenetischer Stammbaum berechnet. Die über den Zweigen angegebenen Werte geben die evolutionäre Entfernung zwischen zwei phylogenetischen Wurzeln an. Dabei wurde die Differenzierung der Leberformen von Ratte und Mensch -in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Saccone et al 1990)- auf 75 My normiert.

7.1.3.3 Mögliche mRNA Sekundärstrukturen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

Aus der mRNA Sequenz der Untereinheit VIa wurden mit einem Computerprogramm die zwölf energieärmsten Strukturen für diese mRNA berechnet. Alle zwölf Strukturen zeigten ein energiearmes Sekundärstrukturelement im Bereich des 5'Genendes. Dieses lag in der Nähe des cDNA Sequenzendes, das aus 14 cDNA Klonen mit 5'RACE Fragmenten charakterisiert wurde (Abschnitt 7.1.2.2). Abbildung 25 zeigt die Sequenz dieses Strukturelements und exemplarisch die drei energieärmsten mRNA Sekundärstrukturen.

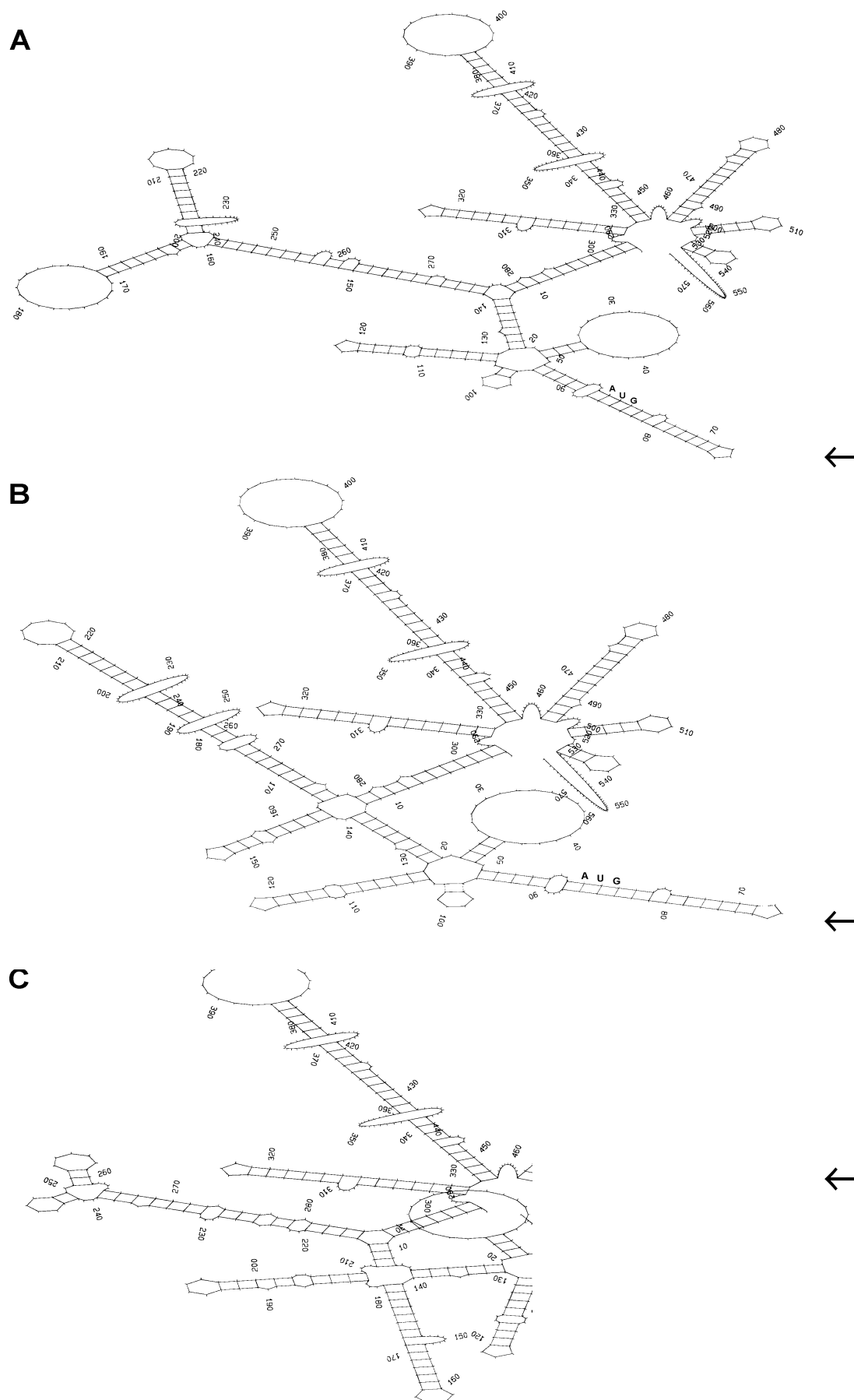


Abbildung 25 A - C

D

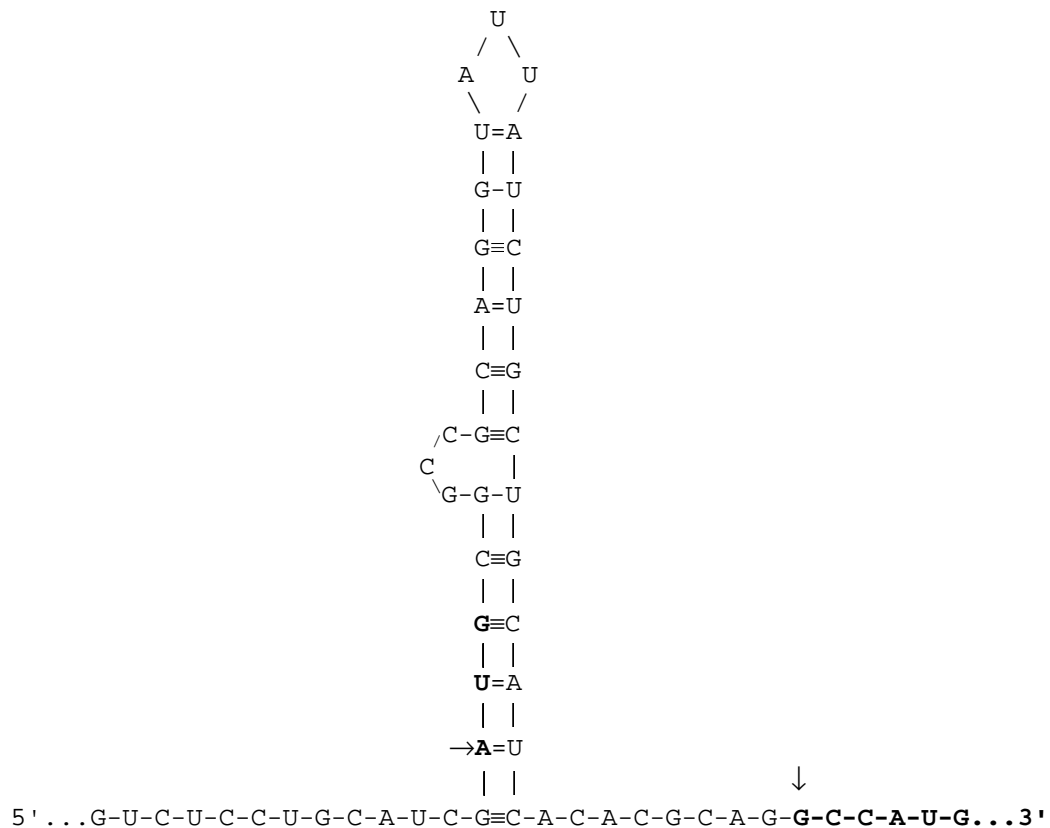


Abbildung 25 Mögliche Sekundärstruktur des 5'mRNA-Endes für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa der Forelle

Über ein Programm des Gendatenbankservers vom deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg wurden aus der mRNA-Sequenz für die Untereinheit VIa mögliche Sekundärstrukturen berechnet. Dargestellt sind die drei energieärmsten Strukturen A, B und C. Die Nukleotide des Startcodons sind jeweils bezeichnet. D) Kompakte GC-reiche Sekundärstruktur, die in unter A, B und C mit Pfeilen gekennzeichnet ist. Fettgedruckt und mit Pfeilen gekennzeichnet ist das Sequenzende, welches in den meisten Klonen mit 5'cDNA Sequenzen für die Untereinheit VIa gefunden wurde, sowie das Startcodon.

Versuche vollständige 5'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa zu isolieren sind bereits früher bei den cDNAs für die Leberformen von Rind (Ewart et al 1991) und Ratte (Schlerf et al 1988) gescheitert. Dabei wurden für die Rattenleber mRNA zwei identisch lange cDNA-Insertfragmente charakterisiert (Schlerf 1990).

Um zu überprüfen, ob diese Schwierigkeiten wie bei der Forelle auf eine mRNA Sekundärstruktur zurückzuführen sein könnten, wurden Sekundärstrukturen für die Anfangsbereiche der Herz- und Lebertranskripte der Rattenuntereinheit VIa

berechnet. Dazu konnten die entsprechenden genomischen Sequenzen der Ratte (Mell et al 1994) benutzt werden. Abbildung 26 zeigt eine kompakte G-C reiche Sekundärstruktur der Leberisoform mRNA. Diese wurde bei acht der 20 energieärmsten Strukturen dieser mRNA berechnet. Die Rechnungen wurden zusätzlich für die 166 Basen Anfangssequenz des 5'Endes der Rattenleber mRNA für die Untereinheit VIa durchgeführt. Die drei energieärmsten Strukturen für diese Sequenz wurden berechnet, von denen diejenige mit der niedrigsten Energie ebenfalls das in Abbildung 26 gezeigte Strukturelement hatte. Die in Abbildung 25 und Abbildung 26 gezeigten mRNA-Strukturen zeigen beide jeweils einen Abstand von acht Nukleotiden zwischen den Sekundärstrukturelementen und den cDNA-Enden, die jeweils von mehreren unabhängigen cDNA-Klonen charakterisiert wurden.

Entsprechende Rechnungen für das 5'-Ende der Untereinheit VIa mRNA für die Rattenherzisoform ergaben keine vergleichbare Sekundärstruktur.

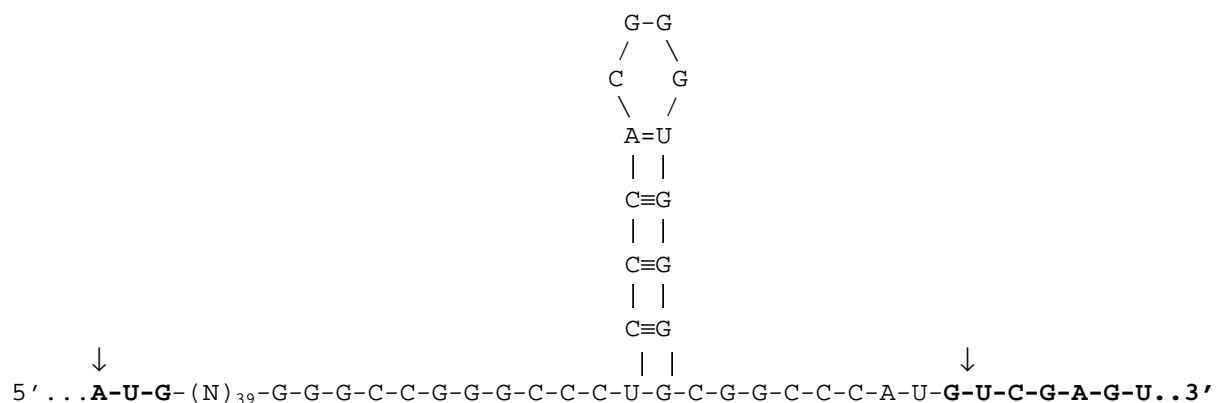


Abbildung 26 Mögliche Sekundärstruktur für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa in Rattenleber

Mit einem Programm des Gendatenbankservers vom deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg wurden die vier mRNA Sekundärstrukturen für die Leberform der Untereinheit VIa der Ratte berechnet. Die drei energieärmsten Strukturen enthielten alle die oben gezeigte GC-reiche Schleife. Dargestellt ist eine G-C reiche Schleife der energieärmsten Struktur, die aus 166 Basen der 5'terminalen Rattenleber mRNA-Sequenz (Mell et al 1994) berechnet wurde. Fettgedruckt und mit Pfeilen gekennzeichnet sind das Startcodon der Precursorsequenz sowie das cDNA-Sequenzende, welches in den beiden längsten cDNA-Klonen enthalten war, die bisher für diese mRNA isoliert wurden (Schlerf 1990).

7.2 Isolierung und Charakterisierung einer cDNA Sequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va aus Forelle

7.2.1 Isolierung und Charakterisierung des 3'cDNA-Endes für die Untereinheit Va

7.2.1.1 Amplifikation von 3'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va durch 3'RACE

Von Susanne Arnold und Maik Hüttemann wurde Cytochrom-c-Oxidase aus Karpfenherz isoliert und über SDS-Gelelektrophorese in die Untereinheiten aufgetrennt. Friedrich Lottspeich konnte durch Peptidsequenzierung die Untereinheit Va identifizieren. Daraus standen zwei Peptidteilsequenzen der Untereinheit Va zur Verfügung, die in einem Vergleich mit den bekannten homologen Sequenzen von Maus (Nielsen et al 1989), Ratte (Droste et al 1989), Rind (Tanaka et al 1979) und Mensch (Rizzuto et al 1988) in Abbildung 27 dargestellt sind. Aus den Peptidteilsequenzen wurden zwei degenerierte, der mRNA Sequenz entsprechende Primer Va+1 und Va+2 abgeleitet. Der Peptidsequenzvergleich zeigt anhand der bekannten vollständigen Sequenzen für die Untereinheit Va, daß der von dem äußeren Va+1 Primer codierte Bereich 105 Aminosäuren vom C-Terminus der Peptidsequenzen entfernt liegt, während die vom inneren Va+2 Primer codierte Sequenz 79 Aminosäuren von den homologen Peptidenden entfernt ist (Abbildung 27). Daraus ließen sich die Längen der translatierten Nukleotidsequenzen, die von diesen Primern in 3'Richtung amplifiziert werden zu 315 bp und 237 bp abschätzen. Zusammen mit 3'nichttranslatierten Sequenzen müßten von den Primern deshalb 3'RACE Produkte von wesentlich mehr als 300 bp amplifiziert werden, die einen Längenunterschied von ca. 80 bp zueinander aufweisen.

Die cDNA von Forellenleber und -herz, die bereits für die Amplifikation des 3'cDNA-Endes der Untereinheit VIa diente, wurde für eine PCR mit dem genspezifischen Va+1 und dem Q₀ Primer benutzt. Dabei wurde aus Herz cDNA ein Fragment von ca. 500 bp amplifiziert, während aus der Leber cDNA unspezifisch Fragmente

zwischen etwa 100 und 590 bp amplifiziert wurden (Abbildung 28). Aus beiden Amplifikationen konnten mit den inneren Primern Va+2 und Q_i Fragmente erzeugt werden, die mit ca. 420 bp die erwartete Größe sowie der erwartete Längendifferenz zu dem 500 bp Produkt des Va+1 Primers hatten (Abbildung 29).

	10	20	30
Maus	S H G S H E T D E E F D A R W V T Y F N K P D I D A W E L R		
Ratte	S H G S H E T D E E F D A R W V T Y F N K P D I D A W E L R		
Rind	S H G S H E T D E E F D A R W V T Y F N K P D I D A W E L R		
Mensch	S H G S Q E T D E E F D A R W V T Y F N K P D I D A W E L R		
Karpfen	T E T D E E F D A R W V T Y F N K P D I D T		
	* * * * *		

Va+1 5'ACIGAYGARGARTTYGAYG3'

	40	50	60
Maus	K G M N T L V G Y D L V P E P K I I D A A L R A C R R L N D		
Ratte	K G M N T L V G Y D L V P E P K I I D A A L R A C R R L N D		
Rind	K G M N T L V G Y D L V P E P K I I D A A L R A C R R L N D		
Mensch	K G I N T L V T Y D M V P E P K I I D A A L R A C R R L N D		
Karpfen	G M N T L I G Y D L V P E		
	* * * * *		

Va+2 5'GAAYACIYTIATHGGITAYG3'

	70	80	90
Maus	F A S A V R I L E V V K D K A G P H K E I Y P Y V I Q E L R		
Ratte	F A S A V R I L E V V K D K A G P H K E I Y P Y V I Q E L R		
Rind	F A S A V R I L E V V K D K A G P H K E I Y P Y V I Q E L R		
Mensch	F A S L V R I L E V V K D K A G P H K E I Y P Y V I Q E L R		
	100		
Maus	P T L N E L G I S T P E E L G L D K V		
Ratte	P T L N E L G I S T P E E L G L D K V		
Rind	P T L N E L G I S T P E E L G L D K V		
Mensch	P T L N E L G I S T P E E L G L D K V		

Abbildung 27 Bekannte maturierte Peptidsequenzen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

Vergleich der Peptidsequenzen für die Untereinheit Va aus Maus (Nielsen et al 1989), Ratte (Droste et al 1989), Rind (Tanaka et al 1979) und Mensch (Rizzuto et al 1988). Das entsprechende Karpfenpeptid wurde von Susanne Arnold aus Karpfenherz isoliert und von Friedrich Lottspeich ansequenziert. Mit Sternen gekennzeichnet sind die Aminosäuren, aus denen die darunter eingerahmten Primersequenzen Va+1 und Va+2 abgeleitet wurden.



Abbildung 28 Amplifikation von 3'cDNA-Enden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

Aus 2.5 µg einer mRNA-Präparation wurde mit dem Q₀Q_idT₁₇-Primer in einer Reverse Transkriptasereaktion cDNA hergestellt. 1 µl dieses Reaktionsansatzes wurde in einem 50 µl PCR Ansatz mit 30 pmol Va+1 Primer und 15 pmol Q₀ Primer eingesetzt. Es wurden 30 Zyklen mit 1min bei 94° C, 40 sec bei 60-46° C und 40sec bei 72° C durchgeführt. Bei den anfänglichen Zyklen wurde die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigt. Gezeigt ist ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit 20 µl der PCR aus Forellenleber cDNA in Spur 1 und mit 20 µl der PCR aus Forellenherz cDNA in Spur 2 sowie 1 µl DNA-MassLadder™ mit den Fragmentgrößen 2000, 1200, 800, 400 und 200 bp in Spur M.

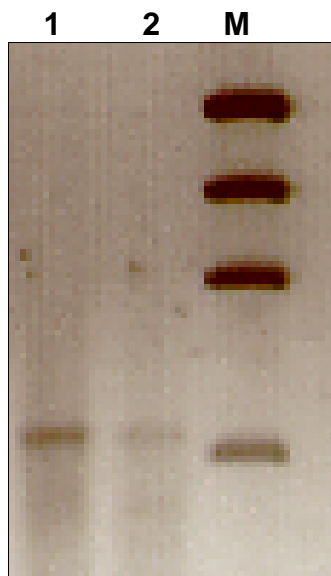


Abbildung 29 Innere PCR zur Reamplifikation von 3'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

Aus je 1 µl einer 1:10 Verdünnung der PCRs aus Forellenherz und -leber cDNA mit dem Va+1 und dem Q₀-Primer wurden weitere PCRs mit den inneren Primern Va+2 und Q_i durchgeführt. Pro 50 µl Ansatz wurden 30 pmol Va+2- und 15 pmol Q_i-Primer eingesetzt. Es wurden 30 Zyklen mit 1min 94° C, 40 sec 60-46° C und 40sec 72° C durchgeführt. Bei den anfänglichen Zyklen wurde die Annealingtemperatur alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigt. Auf ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel wurden 20 µl der PCR aus Forellenleber cDNA in Spur 1, 20 µl der PCR aus Forellenherz cDNA in Spur 2 und 1 µl DNA-MassLadder™ mit den Fragmentgrößen 2000, 1200, 800, und 400 bp in Spur M aufgetragen.

7.2.1.2 Isolierung und Charakterisierung eines Klons mit dem 3'cDNA-Ende der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

Von der Amplifikation der Herz-cDNA mit den Primern Va+1 und Q₀ wurde die 500 bp (Abbildung 28) Bande aus einem Agarosegel eluiert und über eine 'blunt end' Ligation in Vektorplasmide subkloniert. 16 Klone wurden über Plasmidverdaus charakterisiert (Abbildung 30).

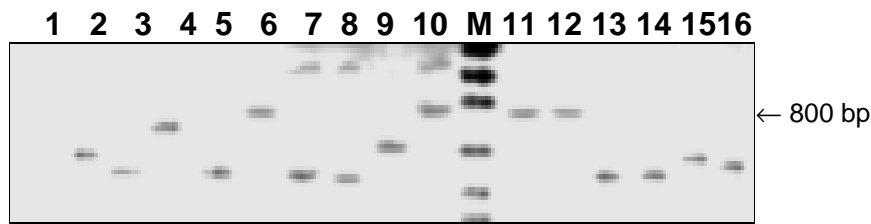


Abbildung 30 Subklone amplifizierter 3'cDNA Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va

Das PCR Fragment aus Forellenherz cDNA mit den Primern Va+1 und Q₀ wurde in SmaI geschnittene PUC18™ Plasmid DNA 'blunt end' ligiert und in E.coli XL1 Blue™ transformiert. Je 1 µl einer 60 µl Plasmidpräparation wurde in einem 10 µl Ansatz mit PvuII verdaut, um die Inserts zusammen mit 330 bp des Vektors auszuschneiden. Gezeigt ist ein ethidiumbromidgefärbtes Agarosegel mit den verdauten Plasmiden der Subklone. Spur M zeigt 0.5 µl MassLadder™ mit Fragmenten von 2000, 1200, 800, 400 und 200 bp.

Die Plasmide mit großen Inserts wurden in einer PCR mit den inneren Primern Va+2 und Q₁ überprüft. Nur für einen Klon konnte ein PCR Fragment nachgewiesen werden (Abbildung 31), dessen Größe den PCR Fragmenten entsprach, welche zuvor mit denselben Primern aus den cDNA Amplifikationen (Abbildung 29) gewonnen wurden. Das cDNA-Insert dieses Klons wurde mit einem vektorspezifischen Primer in einer Plasmidsequenzierung vom 3'Poly-A-Ende aus ansequenziert. Die ermittelte Sequenz enthielt ein Leseraster mit Homologien zu den C-Termini der bekannten Untereinheit Va Peptide und es wurden 3 Primer aus ihr abgeleitet, die zur Amplifikation des 5'cDNA-Endes dienen sollten (Abbildung 38).

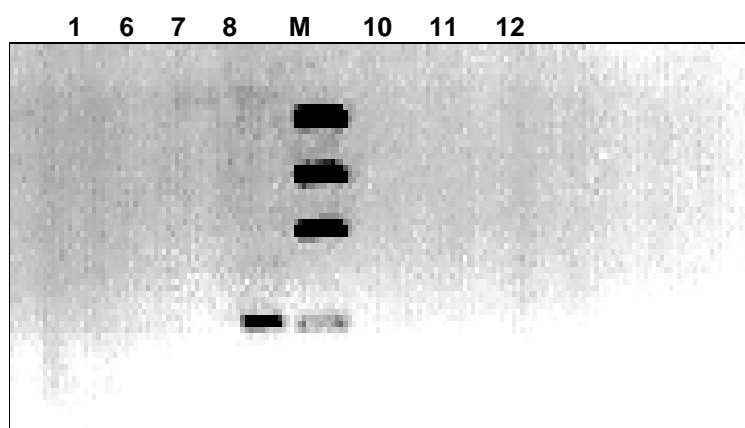


Abbildung 31 Kontroll PCR aus Subklonen mit 3'cDNA-Enden

Je 1 µl einer 1:20 Verdünnung der jeweiligen in Abbildung 30 gezeigten Plasmide wurde für einen 50 µl PCR Ansatz mit 50 pmol Va+2-, 10 pmol Q₁ Primer und 0.2 µl Ventpolymerase eingesetzt. Nach 4 minütigem Denaturieren bei 94° C wurden 30 Zyklen mit 1 min 94° C, 40sec 58-46° C und 40 sec 72° C gefahren. Die

Annealingtemperatur wurde alle zwei Zyklen um 2° C bis auf 46° C herabgesetzt. In Spur M wurde 1 µl MassLadder™ mit den Fragmentgrößen 2000, 1200, 800 und 400 bp aufgetragen.

7.2.1.3 Amplifikation von cDNA für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va in 5'Richtung

Mit dem äußersten genspezifischen Primer in 5'Richtung, Va-5 wurde in einer Reversen Transkription aus Forellenleber-RNA der cDNA-Erststrang hergestellt, der an seinem 3'Ende polyadenyliert wurde. Das Oligonukleotid Q₀Q_idT₁₇ mit den Primersequenzen Q₀ und Q_i sowie einem Poly-T-3'Ende diente zur Erzeugung des cDNA-Zweitstranges. Eine RCR aus den cDNA Zweitsträngen mit dem Q₀ Primer und dem inneren genspezifischen Primer Va-4 lieferte ein Hauptprodukt von ca. 230 bp (Abbildung 32). Reamplifikationen aus dieser PCR mit dem inneren Primern Q_i und dem genspezifischen Primer Va-3 bzw. Va-4 erzeugten dagegen auch wesentlich schwerere Fragmente zwischen 400 und 500 bp, die aufgrund ihrer Länge als 5'cDNA Enden der Untereinheit Va in Frage kamen (Abbildung 33).

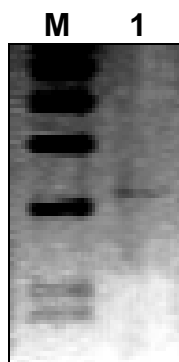


Abbildung 32 Amplifikation von 5'cDNA-Enden der Untereinheit Va

Aus 10 µg einer Forellenleber gesamt-RNA-Präparation wurde eine Reverse Transkriptasereaktion mit dem genspezifischen Primer Va-5 durchgeführt. Nach Abbau der RNA Matritze und Abtrennung von überschüssigen Primern und Nukleotiden mit amicon™ Filtern wurden die cDNA Stränge mit dATP und Terminaler Desoxynukleotidtransferase polyadenyliert. Mit 2 pmol Q₀Q_idT₁₇-Primer wurden in einem 45 µl PCR Ansatz nach 5 minütigem Denaturieren bei 98° C und 2 minütigem Annealen bei 48° C durch Zugabe von 0.5 µl Taq/Pwo DNA-Polymerase cDNA Zweitstränge in 40 min bei 37° C hergestellt. Mit dem Primerpaar Va-4/Q₀ folgten 30 Zyklen einer PCR, bei der die Annealingtemperatur der anfänglichen Zyklen alle zwei Zyklen um 2° C erniedrigt wurde. Pro Zyklus wurde 1min bei 94° C denaturiert, 30sec bei 58-48° C annealt und 1 min bei 72° C elongiert. In Spur 1 wurden 20µl der PCR aufgetragen. Spur M zeigt Fragmente von 80, 100, 200, 300, 400 und 500 bp aus 0.5 µl Bioladder™.

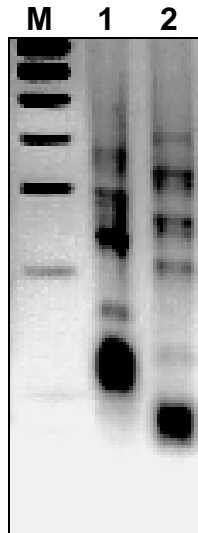
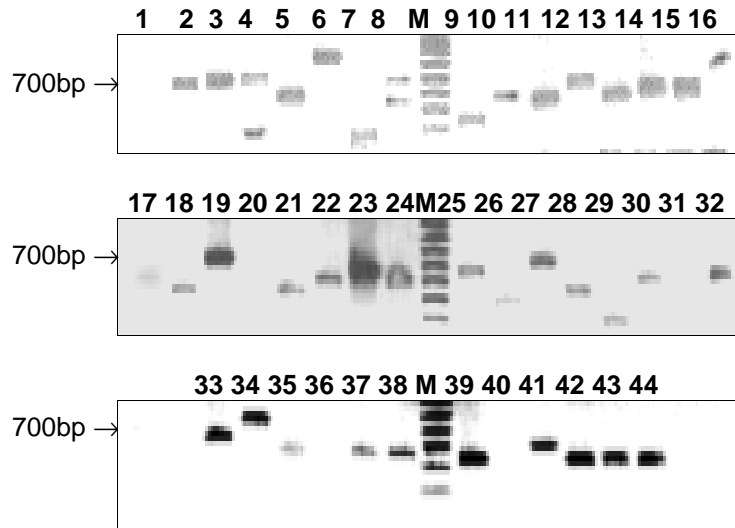


Abbildung 33 Reamplifikation von 5'cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va mit inneren Primern

Von den 5'RACE Produkten aus Forellenleber RNA mit den Primern Va-4 und Q₀ wurde je 1 µl einer 1:20 Verdünnung für eine PCR mit 10 pmol des inneren Primers Q₁ und 50 pmol des genspezifischen Primers Va-4 (Spur 1) bzw. Va-3 (Spur 2) eingesetzt. Nach 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94° C und 30sec Annealing bei einer Temperatur, die alle zwei Zyklen um 2° C von 60 auf 50° C erniedrigt wurde, sowie 1min Elongation bei 72° C wurden 200µl Ansätze mit Ethanol gefällt und auf ein ethidiumbromidgefärbtes 2%iges Agarosegel aufgetragen. Spur M zeigt DNA Fragmente von 200, 300, 400, 500, 600 und 700 bp aus 0.5 µl BioLadder™. Zusätzlich eingrahmt sind die Bereiche, aus denen zur Subklonierung DNA eluiert wurde.

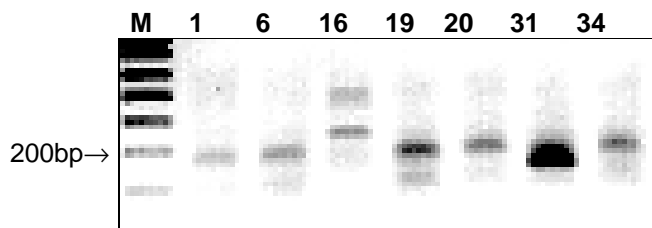
7.2.1.4 Isolierung und Charakterisierung von 5'RACE Klonen der Untereinheit Va

Von der cDNA Amplifikation mit dem genspezifischen Primer Va-4/Q₁ wurde die Bande bei etwa 460 bp und von der Amplifikation mit dem Primerpaar Va-3/Q₁ die Bande von ca. 420 bp aus einem Agarosegel eluiert (vgl. Abbildung 33). Die Eluate wurden über 'blunt end' Ligationen subkloniert. Abbildung 34 zeigt Plasmidverdaus, von 44 Subklonen des PCR Fragments mit dem Va-3 Primer, mit denen die Insertgrößen bestimmt wurden. Aus den Plasmiden mit den größten Inserts wurden PCRs mit dem Va-3 und dem genspezifischen Primer in 3'Richtung Va+1 durchgeführt. Da die von diesen Primern codierten Peptidsequenzen bekannt waren (vgl. Abbildung 27 und Abbildung 38) konnte anhand der homologen Peptidsequenzen von Säugetieren (Abbildung 27) auf eine Fragmentgröße von 180 bp geschlossen werden, die von diesen Primern aus der Untereinheit Va cDNA erzeugt werden sollten. Abbildung 35 zeigt von sieben Klonen Kontroll PCRs, von denen einige diese Fragmentgröße ergaben. Nur bei dem Klon, der in der Kontroll-PCR das stärkste Signal zeigte (Klon31 in Abbildung 35) konnte über die Plasmidsequenzierung eine homologe Sequenz für die Untereinheit Va nachgewiesen werden. Diese Sequenz stellte allerdings nur eine Teilsequenz der

**Abbildung 34**

Die PCR-Produkte von 5'cDNA-Enden aus Forellenleber RNA mit dem genspezifischen Primer Va-3- und dem Q₁-Primer wurden im Längenbereich um 400 bp aus einem Agarosegel eluiert und 'blunt end' in EcoRV geschnittene pBluescript™SK(+) Vektor DNA ligiert. PvuII Verdau wurden aus je 1 µl von 80 µl einer Plasmidpräparation aus E.coli XL1 Blue™ Transformanten dieser Ligation durchgeführt. Gezeigt sind die PvuII Reaktionen, bei denen die einligierten Inserts zusammen

mit 450 bp der Vektor DNA ausgeschnitten wurden, auf ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen. Die Markerspuren (M) zeigen Fragmente von 100 bis 1000 bp mit Größenunterschieden von je 100 bp aus 0.5 µl BioLadder™.

**Abbildung 35**

Die Plasmide von Subklonen (aus Abbildung 34) der PCR Produkte mit den Primern Va-3- und Q₁ wurden für eine PCR mit den genspezifischen Primern Va+1- und Va-3 verwendet. Je 25 µl PCR-Ansatz wurde 1 µl einer

1:40 Verdünnung der 80 µl Plasmidpräparationen mit 5 pmol Va-3- Primer und 25 pmol Va+1- Primer sowie 0.15 µl Ventpolymerase eingesetzt. Nach 3 minütiger Denaturierung der Plasmide bei 94° C wurden 30 Zyklen gefahren, wobei die Annealingtemperatur um 2° C je zwei Zyklen von 60 auf 48° C verringert wurde. 20µl der Reaktionen wurden auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen sowie 0.5 µl BioLadder™ (Spur M) mit den Fragmentgrößen 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp.

gesuchten cDNA dar (vgl. Abbildung 38). Aus der Subklonierung des PCR Produkts mit dem Primerpaar Va-3/Va+1 (vgl. Abbildung 33) wurden 33 Subklone über Restriktionsverdau (Abbildung 36) und Kontroll PCRs (Abbildung 37) untersucht.

Einer dieser Subklone zeigte das erwartete PCR-Fragment und hatte ein cDNA-Insert, das auch einen Aminosäuresequenzbereich codierte, der einen Teil des bekannten N-terminalen Peptidendes der Untereinheit Va aus Forelle (Freund & Kadenbach 1994) darstellte. Aus den Informationen dieses Sequenzanfangs zusammen mit der Sequenz des 3'cDNA-Endes der Untereinheit Va und der N-terminalen Peptidsequenzierung konnte die Aminosäuresequenz der maturierten Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va der Forelle ermittelt werden (Abbildung 38).

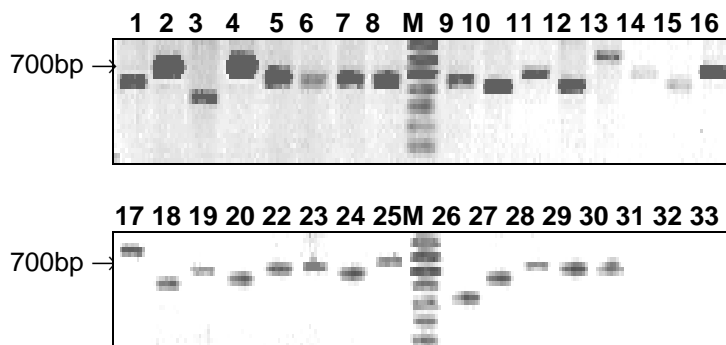


Abbildung 36

Die PCR-Produkte aus der 5'RACE von Forellenleber RNA mit dem genspezifischen Primer Va-4 und dem Q₁-Primer wurden im Längenbereich von 400 bis 500 bp aus einem Agarosegel eluiert (siehe Abbildung 33) und 'blunt end' in EcoRV geschnittene pBlueskript™SK(+) Vektor DNA

ligiert. PvuII Verdauung wurde aus je 1 µl von 80 µl einer Plasmidpräparation von E.coli XL1 Blue™ Transformanten dieser Ligation durchgeführt. Gezeigt sind die PvuII Reaktionen, bei denen die einligierten Inserts zusammen mit 450 bp der Vektor DNA ausgeschnitten wurden, aufgetragen auf ethidiumbromidangefärbte Agarosegele. Die Markerspuren (M) zeigen Fragmente von 200 bis 1000 bp mit Größenunterschieden von je 100 bp.

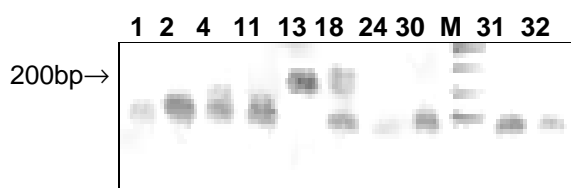


Abbildung 37

PCR aus Plasmiden der Subklone (vgl. Abbildung 36) mit den Primern Va-3- (10 pmol/50 µl-PCR) und Va+2 (25 pmol/50 µl-PCR). Nach vierminütiger Plasmiddennaturierung bei 94° C folgten 30

Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec Annealing von 60 bis 46° C mit einer Temperaturniedrigung von 2° C je 2 Zyklen und 40sec Elongation bei 72° C. Je 20 µl wurden aufgetragen bzw. 0.5 µl BioLadder™ mit den Fragmentgrößen 100, 200, 300 und 400 bp in Spur M.

[illegible]

Abbildung 38 cDNA- und Peptidsequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit
Va der Forelle

Der fettgedruckte Teil der Peptidsequenz war aus einer N-Terminalen Peptidsequenzierung bekannt (Freund & Kadenbach 1994). Unter der Peptidsequenz sind (kursiv) die bei Säugetieren konservierten Aminosäuren angegeben, die beim Forellenprotein unterschiedlich sind (vgl. Abbildung 27). Fettgedruckt sind auch die Sequenzabschnitte, mit denen die Primer Va-5, Va-4 und Va-3 hybridisierten, die zur Amplifikation des 5'Endes der abgebildeten cDNA-Sequenz benutzt wurden, und die Positionen der Primer Va+1 und Va+2, mit denen 3'cDNA-Enden amplifiziert wurden. Pfeile Markieren die Enden der cDNA Inserts von den beiden Klonen, die durch 5'RACE erhalten wurden.

7.3 Bestimmung der Mengenverhältnisse von Transkripten der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa in verschiedenen Forellenorganen

7.3.1 Quantitierungsansatz

Der Befund, daß die Homologien der Untereinheit VIa aus Forelle zu den Isoformen der Säugetiere etwa gleichgroß ist wie die der Isoformen untereinander, läßt die Abwesenheit von gewebsspezifischen Isoformen der Untereinheit VIa in der Forelle vermuten. Um dies zu prüfen wurde untersucht, ob die Transkription der gefundenen Sequenz für die Untereinheit VIa der Forelle in einigen Organen zugunsten einer möglichen anderen Isoform vermindert ist. Dazu wurden die mRNA-Mengen für die Untereinheit VIa in verschiedenen Organen bestimmt. Die mRNA-Menge der Untereinheit Va, von der es auch in anderen Organismen keine Isoformen gibt, diente dabei als Referenz.

Nach einer Methode von Andreas Becker (Becker et al 1996) wurden die Mengen der PCR Produkte aus Reversen Transkriptionen nach verschiedenen Anzahlen von PCR Zyklen bestimmt. Aus RNA Präparationen von Forellenherz, -muskel, -kiemen, -milz und -leber wurde in Reverse Transkriptasereaktionen mit einem Poly-T-Primer cDNA erzeugt. Mit Paaren aus den genspezifischen Primern, die zur Isolierung der 3'- und 5'-cDNA Enden der Gene für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa dienten, wurden Teilsequenzen dieser Gene amplifiziert. Für die Untereinheit VIa sollte mit den Primern VIa+2 und VIa-4 eine 216 Nukleotide lange Teilsequenz vermehrt werden (siehe Abbildung 9) und mit dem Primerpaar Va+1/Va-3 eine 230 Nukleotide lange Teilsequenz des Gens für die Untereinheit Va (siehe Abbildung 38).

Zur DNA-Quantitierung wurden die mit Sybr-Green angefärbten Agarosegele von den PCR Fragmenten ultraviolett belichtet und über einen Scanner per Computer ausgewertet. Es stand ein Programm zur Verfügung, das die Anzahl der von einer DNA-Bande erzeugten Bildpunkte ermittelte. Auf diese Weise wurden relative Werte für die Bandenintensität und die DNA-Mengen erhalten. In Vergleichsspurten wurden definierte Mengen eines DNA Fragments aufgetragen, dessen Bandenintensitäten

auf die gleiche Weise bestimmt wurde. Aus diesen Vergleichswerten wurde ein Mittelwert für die Anzahl der Bildpunkte pro ng DNA gebildet, mit dem die Absolutmengen der PCR Produkte berechnet werden konnten. Aus der logarithmischen Auftragung der DNA-Mengen gegen die Zyklenzahlen wurden Regressionsgeraden bestimmt, deren Ordinatenabschnitte ein relatives Maß für die Ausgangsmenge an mRNA von einer Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit lieferte, die in der PCR amplifiziert wurde.

7.3.2 Quantitative Amplifikationen von mRNA-Sequenzen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und VIa aus verschiedenen Organen

PCRs mit bis zu 30 Zyklen und einer Annealingtemperatur, die Schrittweise von 60 auf 50° C abgesenkt wurde, ergaben Amplifikationen von Transkripten für die Untereinheit VIa. Die PCRs lieferten scharfe Banden aber mit schwacher Intensität

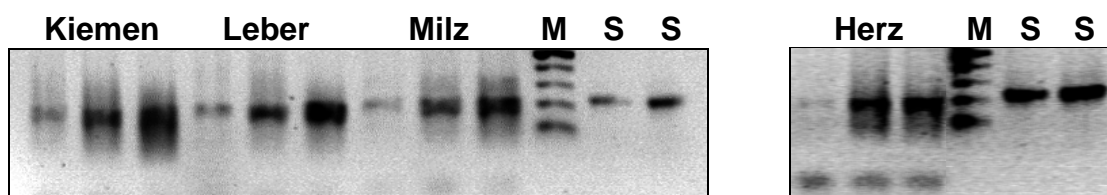


Abbildung 39 Quantitative PCR von cDNA Sequenzen der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa

Mit dem Q₀Q₁dT₁₇-Primer wurden aus je 5.5 µg gesamt RNA von Forellenkiesen, -leber, -milz und -herz Reverse Transkriptasereaktionen durchgeführt. Je 1 µl einer 1:10 Verdünnung dieser Reaktionen diente als Templates für einen 30 µl PCR Ansatz mit den genspezifischen Primern VIa+2 (30 pmol) und VIa-4 (6 pmol). Von jedem Template wurden Reaktionen nach 26, 28 und 30 Zyklen beendet. Die Denaturierungstemperatur betrug 94° C für 1 min, die Annealingtemperatur der ersten Zyklen wurde alle zwei Zyklen um 2° C von 60 bis auf 50° C abgesenkt, die Elongation erfolgte bei 72° C in 40sec. Je 10 µl der PCRs wurden - nach ansteigender Zyklenzahl - von links nach rechts - auf ein Agarosegel mit Sybr-Green™ aufgetragen.

1 µl einer 1:20 Verdünnung einer Plasmidpräparation des cDNA Klons mit dem 5'-Sequenzbereich der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va und dem Va-4-Primer diente zur Erzeugung eines 230 bp Fragments mit den inneren Primern Va+1 und Va-3 in einer 50 µl PCR mit denselben Amplifikationsbedingungen. Dieses Fragment wurde mit einer QiaQuickspin™-Säule gereinigt, photometrisch quantitiert und als Mengenstandard zu je 10 und 20 ng in die Spuren S aufgetragen. Spur M zeigt 0.5 µl BioLadder™ mit Fragmentgrößen von 500, 400, 300, 200 und 100 bp.

auch einen Hintergrund von unspezifischen PCR Produkten. Abbildung 39 zeigt PCR-Produkte aus Kiemen- Leber- Milz- und Herz mRNA, die auf diese Weise erhalten wurden. Mit dem Primerpaar für die Untereinheit Va konnten unter denselben Bedingungen teils keine und teils nur sehr schwache Banden erzeugt werden.

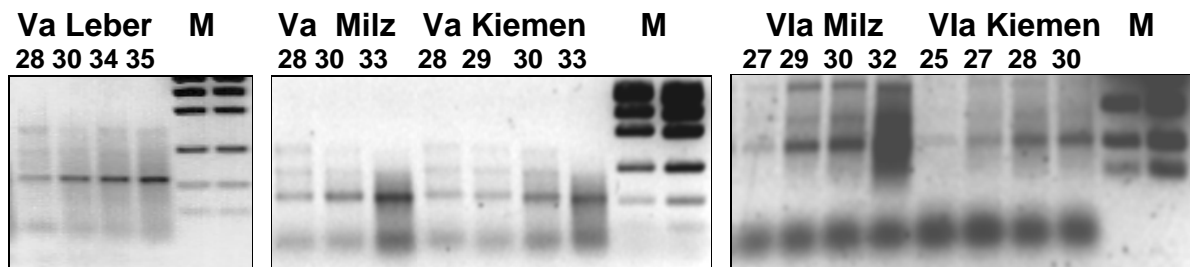


Abbildung 40 Quantitative PCR von cDNA-Sequenzen der Untereinheiten Vla und Va aus verschiedenen Organen

Je 1 μ l von Reverse Transkriptasereaktionen mit dem Q₀Q₁dT₁₇-Primer von gesamt RNA verschiedener Forellenorgane dienten als Template für PCRs mit verschiedenen Zyklenzahlen und den Primerpaaren Va+1 und Va-3 für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va bzw. Vla+2 und Va-7 für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Vla. Es wurden 33 μ l PCRs mit 35 pmol des degenerierten Forwardprimers und 0.15 μ l Vent DNA-Polymerase angesetzt. Nach fünf Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec bei einer Annealingtemperatur von 48° C und 40sec Elongation bei 72° C wurden in einem Volumen von 2 μ l weitere 0.15 μ l Polymerase und 7 pmol des nichtdegenerierten Reverseprimers zugegeben. Es folgten bis zu 30 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94° C, 30sec bei einer Annealingtemperatur, die nach je zwei Zyklen um 2° C von 60 auf 50° C abgesenkt wurde, und ein Elongationsschritt von 40 sec bei 72° C. 5 μ l einer Reaktion wurden auf ein Agarosegel mit Cybergreen™ aufgetragen. In den Spuren M wurden nebeneinander jeweils 0.5 und 1 μ l DNA MassLadder™ mit Fragmentgrößen von 2000, 1200, 800, 400, 200 und 100 bp aufgetragen. Die 200 bp Banden dieses Markers enthielten 10 ng DNA pro μ l und dienten als Mengenstandard. Die Spuren der abgebildeten Agarosegele sind mit den Zyklenzahlen (einschließlich der fünf Anfangszyklen mit nur einem Primer) bezeichnet, nach denen die PCRs beendet wurden. Darüber ist das Organ angegeben, aus dem das cDNA-Template gewonnen wurde, sowie die Bezeichnung der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit, deren cDNA amplifiziert wurde. Die schwachen Banden mit cDNA der Untereinheit Vla aus Muskel sind zusätzlich bei höherer Belichtung dargestellt.



Um gut auswertbare DNA-Mengen zu erhalten, wurde die zehnfache Menge an cDNA in 5 PCR-Zyklen mit dem degenerierten genspezifischen Forwardprimer Va+1 für die Untereinheit Va bzw. Vla+2 für die Untereinheit Vla einzelsträngig vervielfältigt. Aus diesen Ansätzen wurden dann in PCRs mit den genspezifischen Primerpaaren Va+1/Va-3 bzw. Vla+2/Vla-4 Teilsequenzen beider Gene aus verschiedenen Organen amplifiziert (Abbildung 40). Zudem wurde die Menge an DNA-Polymerase erhöht. Alle Amplifikationen zeigten wie erwartet ansteigende DNA-Mengen bei ansteigenden Zyklenzahlen (Abbildung 41). Nur eine PCR aus Muskel cDNA mit 30 Zyklen ergab eine geringere DNA-Menge als die entsprechenden PCRs mit weniger Zyklen, was auf einen Pippetierfehler zurückzuführen war.

7.3.3 Häufigkeiten von cDNA Transkripten für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und Vla

Abbildung 41 zeigt logarithmische Auftragungen der erhaltenen DNA-Mengen gegen die PCR-Zyklenzahlen für die Amplifikationen beider Genteilsequenzen in den Forellenorganen Milz, Kiemen, Muskel, Leber und Herz. Die Geradensteigungen zeigten, daß die Vervielfältigungen mit dem genspezifischen Primerpaar Va+1/Va-3 wesentlich langsamer abliefen als mit dem Primerpaar Vla+2/Vla-4. Die Mengenverhältnisse zwischen den mRNAs von den Untereinheiten Vla und Va sind im Rahmen der Fehlergrenzen in allen Organen gleich. Hohe Anfangskonzentrationen an mRNA der untersuchten Gene wurden in Herz und Muskel gefunden, während diese mRNA Konzentrationen in Kiemen, Milz und Leber deutlich geringer waren. In allen Organen wurden geringere Mengen an mRNA der Untereinheit Vla als mRNA für die Untereinheit Va gefunden. Auch die Geradensteigungen und somit die Effektivitäten der PCR waren in allen Organen unterschiedlich.

A

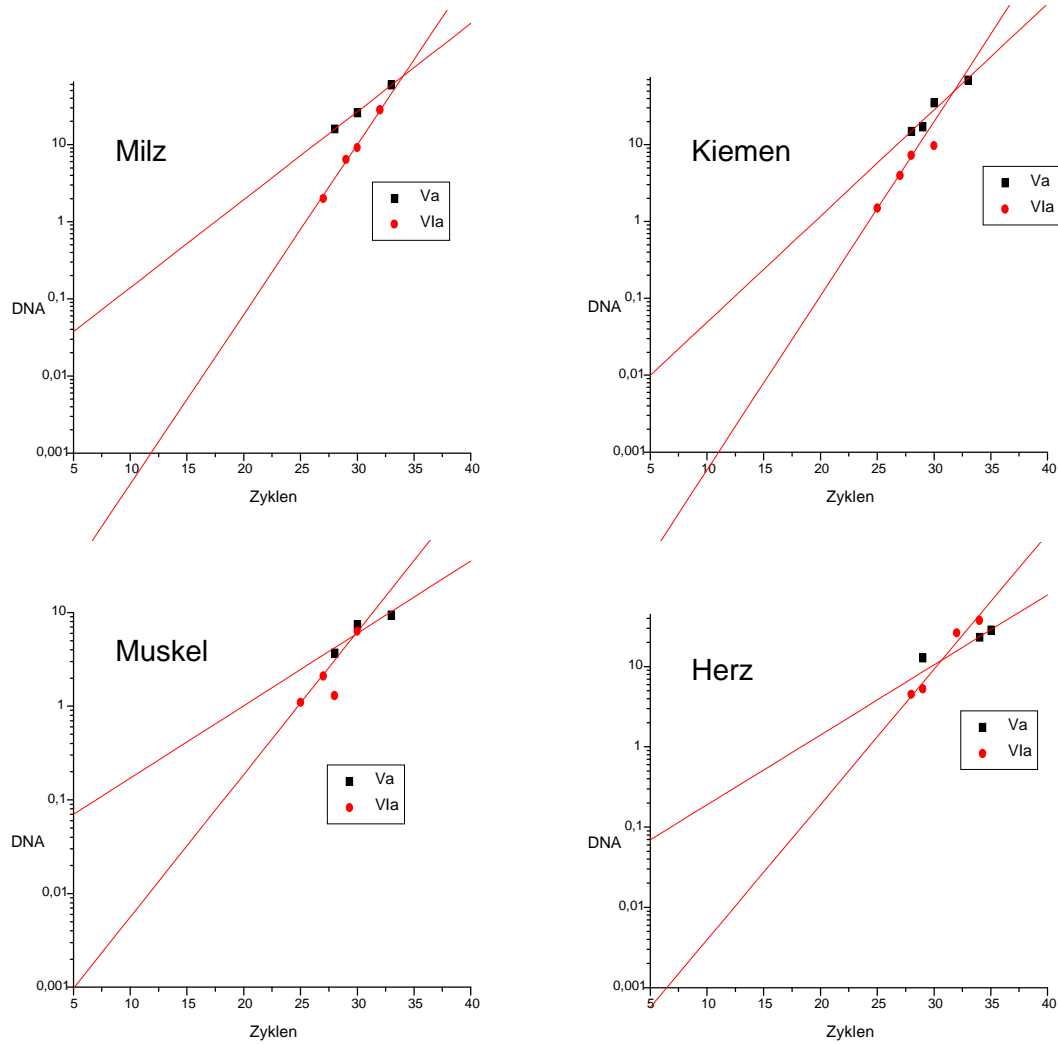


Abbildung 41 A

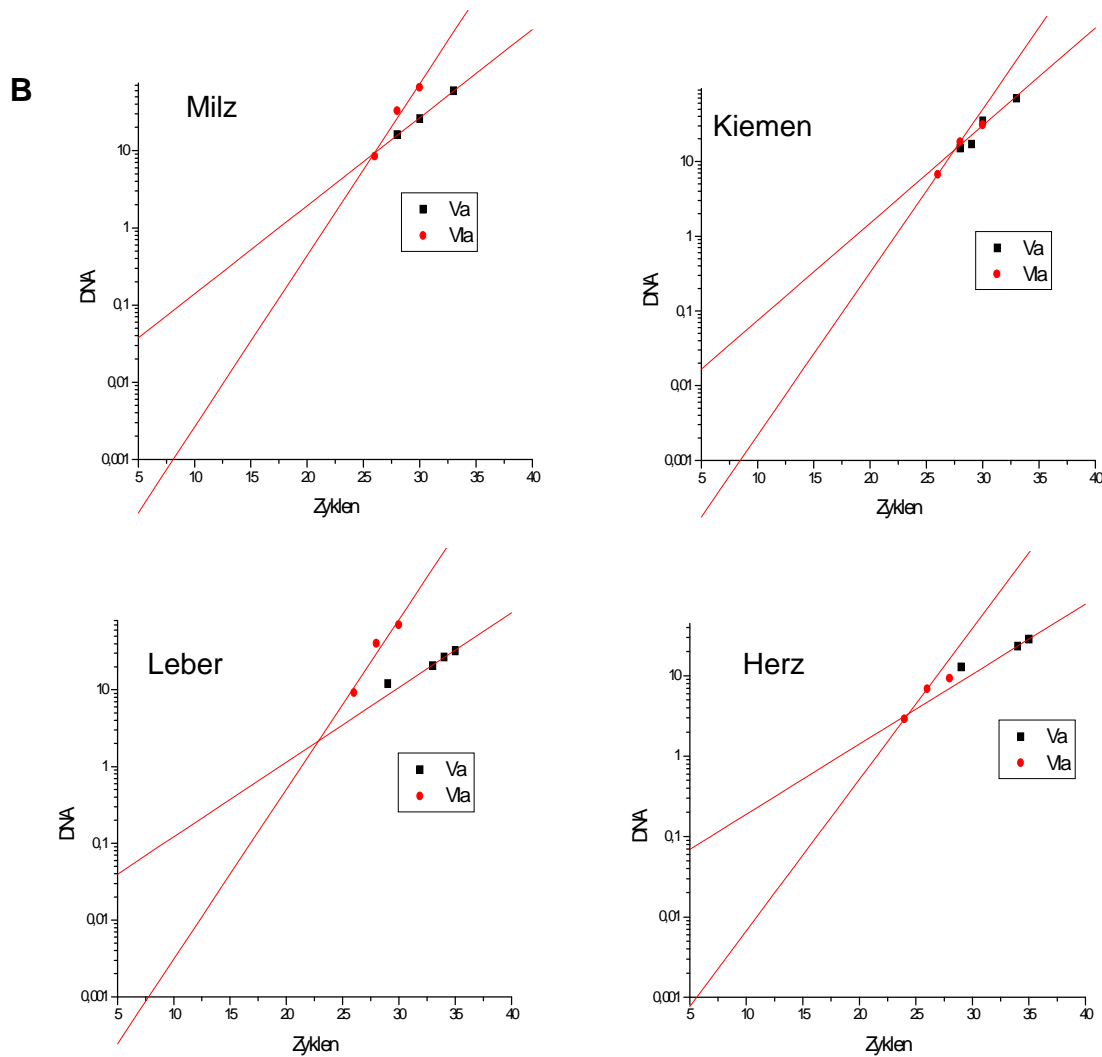


Abbildung 41

Für die PCRs aus den cDNAs verschiedener Forellenorgane mit genspezifischen Primerpaaren für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten Va und Vla wurden die erzeugten DNA Mengen (in ng pro 5 μ l PCR) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Gezeigt sind jeweils Regressionsgeraden für PCRs dieser Primerpaare. Unter A sind Meßwerte von anderen PCR Protokollen (PCRs für die Untereinheit Vla aus Abbildung 39 bzw. aus Abbildung 40 für die Untereinheit Va) mit den Vla Primern gezeigt, als in den in B dargestellten Meßkurven (PCRs aus Abbildung 40). Das Verhältnis des Ordinatenabschnitts für die PCRs mit dem Vla Primerpaar zu dem entsprechenden Wert für das Va Primerpaar wurde für jedes Organ berechnet und der Wert aus Milz auf 100 normiert. Das Balkendiagramm C zeigt die normierten RNA-Mengenverhältnisse der Untereinheiten Vla zu Va in den Organen.



8 Diskussion

8.1 Diskussion der Methoden

Die Isolierung von 3'cDNA-Enden erwies sich als unproblematisch. Kleine Sequenzunterschiede zwischen zwei Klonen mit demselben 3'cDNA-Ende der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa (Abschnitt 7.1.1.2) zeigten aber, daß die verwendete Vent-DNA-Polymerase bedeutende Fehlerraten hat. Mit einem Gemisch der Polymerasen Taq und Pwo von Boehringer wurden wesentlich bessere Erfahrungen gemacht. Bei allen Charakterisierungen von 5'cDNA-Klonen wurden übereinstimmende cDNA-Sequenzen gefunden, die sich nur in ihrer Länge unterschieden. Die Sequenzunterschiede zwischen den beiden Klonen mit 3'-cDNA-Enden der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa sind in fast allen Fällen auf die fehlerhafte Hybridisierung einer Thyminbase von einem der beiden cDNA-Stänge zurückzuführen. Dies beruht darauf, daß Thymidin von allen vier Nukleotiden die geringste Bindungsspezifität hat.

Spezifische Amplifikationen wurden auch mit dem VIa+2 Primer erhalten, obwohl beim Vergleich der Primersequenz mit der isolierten Sequenz des 5'cDNA-Endes auffällt, daß dieser Primer in seinem 5'Endbereich an drei Positionen Mißpaarungen haben mußte. Die ersten 10 Nukleotide des 3'Primerendes, von denen 7 G und C waren, sorgten dennoch für eine gute Hybridisierung. In Übereinstimmung damit zeigte dieser Primer bei den Amplifikationen zur PCR-Quantitierung hohe Effektivitäten.

Im Gegensatz zur Isolierung von Klonen der 3'cDNA-Enden erwies sich die Isolierung von 5'cDNA-Enden als schwierig. Bei der Amplifikation von 5'cDNA-Enden wurden für die Untereinheit VIa viele Klone mit einem cDNA-Ende gefunden, das 55 Basen in 3'Richtung vom Startcodon entfernt lag. Dies spricht dafür, daß die Reverse Transkriptase bei der cDNA Herstellung an einer bestimmten Stelle behindert wurde (Abschnitt 7.1.2.2.). Ein solches 'Pausieren' aufgrund von

Sekundärstrukturen ist für DNA-Polymerasen bereits untersucht worden (Kang et al. 1995).

Weitere Faktoren begünstigten die Isolierung von zu kurzen cDNA-Fragmenten. Obwohl durch RNA-Gelelektrophorese die Intaktheit der RNA Präparationen geprüft wurde, konnten aus diesen Präparationen oft keine eindeutigen, ausreichend langen PCR-Fragmente von 5'cDNA-Enden gewonnen werden. Unterschiedliche Längen von 5'cDNA-Enden können durch einen teilweisen mRNA Abbau oder durch verschieden lange Polyadenylierungen der 5'cDNA-Enden entstehen. Möglicherweise waren die Effektivitäten für Amplifikationen von kurzen cDNA-Fragmenten besonders hoch und ließen die gewünschten PCR-Fragmente in den Hintergrund treten. In einer Kontroll-PCR mit genspezifischen Primern in 3'Richtung konnten aus den Amplifikationen in 5'Richtung eindeutige Banden in den erwarteten Größen erzeugt werden. Dies zeigte, daß in den Amplifikationen in 5'-Richtung die gewünschten cDNAs enthalten waren (Abschnitt 7.1.1.2). In einer weiteren ('nested') PCR mit inneren Primern wurde die Spezifität der Amplifikation von 5'cDNA-Enden erhöht.

Aus Agarosegelen wurden cDNA Fragmente im erwarteten Größenbereich aus Amplifikationen von 5'cDNA-Enden ausgewählt, eluiert und subkloniert. Die Charakterisierung von Subklonen zeigte kleinere Fragmentgrößen als die, welche bei der Gelelektrophorese ausgewählt wurden. Bessere Ergebnisse wurden mit Elutionen erzielt, bei denen aus den Agarosegelen Längenbereiche ausgewählt wurden, die 50 bis 100 bp größer waren als die benötigten PCR Produkte (Abschnitt 7.1.2.3.). Außerdem wurden höherprozentige Agarosegele verwendet, um die Größenauftrennung der cDNA-Fragmente zu verbessern. Die ungenügende Trennwirkung der Agarosegele stellte somit ein wesentliches Problem bei der Isolierung vollständiger 5'cDNA-Enden dar. Ein weiteres Problem ist, daß kurze DNA-Fragmente bei der Ligation in Klonierungsvektoren bevorzugt werden.

Um die Existenz von Isoformen der Untereinheit VIa in der Forelle ausschließen zu können, wurden die Mengenverhältnisse von mRNAs der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa und der Untereinheit Va, die nicht in Isoformen vorkommt, in

verschiedenen Organen bestimmt. Zum Vergleich der Transkription dieser Gene wurde die DNA-Quantifizierungsmethode von Becker et al. (1996) gewählt. Dazu wurden von allen Organen gleiche RNA-Mengen zur cDNA Herstellung mit einem Poly-T-Primer eingesetzt. Teilsequenzen beider Gene wurden für jedes Organ aus dem gleichen cDNA-Syntheseansatz vervielfältigt. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die Mengenbestimmungen untereinander vergleichbar sind. Da die Effektivität der Reversen Transkription unbekannt ist, können Absolutmengen der mRNA-Spezies nicht bestimmt werden. Die PCRs wurden teilweise mit fünf Anfangszyklen mit nur einem Primer gefahren, in denen die cDNA asymmetrisch und proportional zur Zyklenzahl vervielfältigt wurde. Die Extrapolation von Regressionsgeraden aus logarithmischen Auftragungen auf die Ordinatenabschnitte liefert in diesen Fällen nur relative Werte für die Templatemengen, die aber untereinander vergleichbar sind.

PCR Amplifikationen lassen sich durch folgende Gleichung beschreiben:

$$c = c_0 a^z \quad \text{Gleichung 1}$$

wobei c_0 die Ausgangsmenge, c die amplifizierte Menge an DNA und z die Zyklenzahl ist. a ist die Effektivität, die im Idealfall einer Verdopplung von DNA in jedem Zyklus bei zwei läge. Die logarithmische Form dieser Gleichung beschreibt eine Geradengleichung, aus deren Ordinatenschnittpunkt die DNA-Ausgangsmenge und aus deren Steigung die Effektivität ermittelt werden kann:

$$\log c = \log c_0 + z \log a \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Schnittpunkte der Geraden für Amplifikationen von zwei Ausgangs-DNAs errechnen sich danach gemäß Gleichung 3 :

$$z = (\log c_{0,v_a} - \log c_{0,v_{1a}}) / (\log a_{0,v_{1a}} - \log a_{0,v_a}) \quad \text{Gleichung 3}$$

In Gleichung 3 steht im Zähler das Anfangsmengenverhältnis zweier Transkripte und im Nenner das Verhältnis der Effektivitäten zweier Amplifikationen. Die Faktoren,

welche die Effektivitätsunterschiede der PCRs bewirken, sind die Hybridisierungseigenschaften der Primer und die unterschiedliche Menge an Fremd-DNA bei cDNA-Populationen verschiedener Organe. So wurden bei allen Organen verschiedene Effektivitäten gefunden. Ebenso unterschieden sich die Effektivitäten der mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführten PCRs von den beiden Genteilsequenzen. Die Effektivitätsverhältnisse der mRNA-Amplifikationen beider Gene müßten dagegen in allen Organen gleich sein. Das bedeutet im Zusammenhang mit Gleichung 3, daß bei gleichen Mengenverhältnissen der beiden Templates auch die Abzissenwerte der Geradenschnittpunkte in allen Organen gleich sein müssen. Dies wurde im Rahmen der Fehlergrenzen nachgewiesen und bestätigt, daß in allen Organen etwa gleiche Mengenverhältnisse von Transkripten beider Gene vorliegen. Tabelle 4 gibt die Zyklenzahlen an, bei denen die Schnittpunkte für die Amplifikationen aus verschiedenen Organen gefunden wurden.

	Milz	Kiemen	Leber	Herz	Muskel
PCR Set A	34	32		31	31
PCR Set B	26	28	28	25	

Tabelle 4

PCR-Zyklenzahlen, bei denen die Geradenschnittpunkte für die Amplifikationen von Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa und -Va Transkripten in verschiedenen Organen lagen. Die Werte beider Tabellenzeilen wurden bei verschiedenen PCR-Bedingungen erhalten und sind daher nur innerhalb einer Zeile vergleichbar (Siehe auch Abbildung 41 A und B).

Bei den PCRs wurde jeweils ein Hintergrund von unerwünschten Produkten mitamplifiziert, der die Genauigkeit der Quantitierung verminderte. Dies ist vor allem auf die Verwendung von degenerierten Primergemischen zurückzuführen. Die degenerierten Primer wurden in größeren Mengen als die nichtdegenerierten Gegenprimer eingesetzt, da jeweils nur für einen Teil des Gemisches Hybridisierungen zu erwarten waren. Asymetrische Primermengen können Einzelstrang-DNA-Anteile erzeugen, die ein anderes Elektrophoreseverhalten zeigen als Doppelstrang DNA. Außerdem ermöglichen solche Primer durch die größere Sequenzvielfalt mehr Mißannealings, die zu unspezifischen Amplifikationen führen können. Eine weitere Fehlerquelle bildeten Pippetierfehler, die exponentiell in die

Werte eingehen. Um diesen Fehler zu verkleinern wurden jeweils nur PCRs eines Primerpaars für einen Vergleich verwendet, die gleichzeitig angesetzt wurden.

Die Werte für die Mengenverhältnisse der Transkripte der Untereinheit Va und VIa weisen im Rahmen der Meßungenauigkeit Schwankungen von $\pm 20\%$ auf.

Weiterhin zeigte sich, daß die Effektivitäten der PCRs mit dem Primerpaar für die Untereinheit Va wesentlich geringer waren als bei den Amplifikationen von cDNA der Untereinheit VIa. In allen Organen wurden größere mRNA-Mengen für die Untereinheit Va als für die Untereinheit VIa nachgewiesen. Die Fehlergrenzen lassen auch die Aussage zu, daß die RNA von Herz und Muskel einen größeren Anteil an Transkripten der beiden Cytochrom-c-Oxidase Gene enthalten als die Organe Milz, Leber und Kiemen.

8.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa war bisher aus Hefe (Taanman, Capaldi 1992) und aus verschiedenen Säugetieren bekannt (siehe Tabelle 1). Dennoch konnte dieses Peptid in der Forelle über die Cytochrom-c-Oxidase-Isolierung nicht nachgewiesen werden (Freund, Kadenbach 1994). Dieser Nachweis gelang über die cDNA-Isolierung mit degenerierten Primern, die aus Peptidsequenzen der Karpfenuntereinheit VIa abgeleitet wurden. Die Untereinheit VIa kann also offenbar bei der Enzymisolierung abgelöst werden und verloren gehen.

Die Sekundärstruktur, die im 5'Bereich der Untereinheit VIa mRNA der Forelle identifiziert wurde, stellte ein Problem bei der Isolierung der vollständigen Gensequenz dar. Für die cDNAs der Untereinheit VIa Leberformen aus Rind (Ewart et al. 1991) und Ratte (Schlerf et al. 1988) wurden ebenfalls Sequenzen mit unvollständigen 5'Enden veröffentlicht. Bei der Ratte wurde das vollständige 5'cDNA-Ende über die Isolierung und Charakterisierung der genomischen Sequenz bestimmt (Mell et al. 1994). Die Vermutung, daß bei den mRNA-Leberformen der Untereinheit VIa starke Sekundärstrukturen in ähnlicher Position wie bei der Forellen mRNA die

Transkription in cDNA stoppen können, wird durch mehrere Befunde bestätigt. So wurden bei der Isolierung der unvollständigen Rattenleber cDNA zwei Klone isoliert, deren identische cDNA-Inserts mit demselben Nukleotid aufhören (Schlerf 1990). Ein solch unwahrscheinliches Ereignis wäre durch ein Pausieren der Reversen Transkriptase bei der cDNA Synthese erklärbar. Genomische DNA bildet als Doppelstrang keine vergleichbaren Sekundärstrukturen. So konnte bei der Ratte auch nur durch die Isolierung und Charakterisierung der genomischen Sequenz das 5'-mRNA-Ende der Leberform ermittelt werden. Computerrechnungen zeigten eine Sekundärstruktur des 5'-mRNA-Endes in der Nähe dieses isolierten cDNA-Endes. Die berechneten mRNA-Sekundärstrukturelemente lagen sowohl bei der Forellen- als auch bei der Rattenleber mRNA in einem Abstand von acht Basen zu dem cDNA-Ende, das in beiden Fällen aus mehreren unabhängigen cDNA-Klonen charakterisiert wurde. Es lag also offenbar in beiden Fällen ein 'Pausieren' der Reversen Transkriptase vor, welche die Transkription offenbar acht Basen vor einem Sekundärstrukturhindernis abbricht. Eine vergleichbare Sekundärstruktur konnte für die Rattenherzisoform dieser mRNA nicht berechnet werden (Abschnitt 7.1.3.3). Für die entsprechende Rinderleber cDNA ist bisher nur eine cDNA bekannt (Ewart et al. 1991), die in 5'Richtung ein Nukleotid früher aufhört als die längsten Rattenleber-cDNA-Klone der Untereinheit VIa, was beim Vergleich dieser Homologen Sequenzen zu sehen ist. Durch veränderte Bedingungen bei der Reversen Transkription (Abschnitt 7.1.2.3) und die Untersuchung einer Vielzahl von Klonen ist es in dieser Arbeit gelungen, auf cDNA-Ebene vollständige Sequenzen für eine mRNA der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa zu isolieren, die in ihrem 5'Terminus eine stabile Sekundärstruktur aufweist. Dies war bisher bei den Leberformen von Rind (Ewart et al. 1991) und Ratte (Schlerf et al. 1988) offenbar nicht möglich.

Die Sequenz der Untereinheit VIa aus Forelle ermöglicht erstmals zusammen mit der entsprechenden Karpfensequenz einen Vergleich der Cytochrom-c-Oxidase-Struktur zwischen kaltblütigen und warmblütigen Tieren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist davon auszugehen, daß in der Forelle keine gewebespezifischen Isoformen der Untereinheit VIa exprimiert werden. Die Peptidsequenzen der Fische Forelle und Karpfen für die Untereinheit VIa zeigen untereinander hohe Homologien. Die Homologien der Fischpeptide zu den Herzformen der Säugetiere liegen wie die zu den Leberformen bei ca. 50% und sind damit gleich hoch wie die Homologien der Isoformen untereinander (Abschnitt 7.1.3). Dies legt eine Abwesenheit von

Isoformen in Fischen nahe, die durch weitere Befunde gestützt wird. So wurde das 3'Ende der cDNA aus Forellenherz mRNA isoliert, während das 5'cDNA-Ende aus Forellenleber mRNA mit Primersequenzen aus der untranslatierten Sequenz dieses 3'Endes isoliert wurde. Dieser untranslatierte Bereich ist zwischen Herz- und Leberform der Säugetiere nur wenig konserviert (Schlerf et al. 1988). Außerdem liegen in den Organen Leber, Milz, Kiemen, Herz und Muskel gleiche Mengenverhältnisse von Transkripten dieser Untereinheit und der Untereinheit Va vor, von der es keine Isoformen gibt (Abschnitt 7.1.3).

In Säugetieren wurden für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa stets zwei gewebespezifische Isoformen gefunden. Für Rinder-Cytochrom-c-Oxidase konnte eine muskelspezifische ATP abhängige Regulation nachgewiesen werden, an der die Herzform der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa beteiligt ist (Frank & Kadenbach 1996). Die Herzform wurde in Herz- und Skelettmuskel nachgewiesen (Schlerf et al. 1988, Ewart et al. 1991). In diesen Organen treten zwischen Muskelaktivität und Ruhezustand große Schwankungen der Energieladung auf. Da mit geringem Energieumsatz im Ruhezustand wenig Wärme anfällt, ist eine gezielte Wärmeerzeugung zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur denkbar. Dafür spricht die Verminderung des Enzymwirkungsgrades (H^+/e^- -Stöchiometrie) durch ATP (Frank & Kadenbach 1996). Dieser Mechanismus dürfte in Fischen, deren Körpertemperatur 1-2° C über der Wassertemperatur liegt, nicht vorkommen. Dafür spricht die Abwesenheit von Isoformen der Untereinheit VIa in Forelle und Karpfen zusammen mit der Tatsache, daß die Herzisoform dieser Untereinheit beim Rind die gewebespezifische Regulation vermittelt.

Eine muskelspezifische Bindungsstelle für die ATP vermittelte Regulation konnte bei der Herzuntereinheit VIa im N-terminalen Peptidbereich, welcher der Mitochondrienmatrix zugewandt ist, lokalisiert werden (Anthony et al. 1993). In Übereinstimmung damit zeigen die Isoformen der Untereinheit VIa in ihren C-Termini wesentlich größere homologe Bereiche als in den N-Termini (Abbildung 23). Im Vergleich der Fischsequenzen mit den Säugetierisoformen wurden 13 Stellen gefunden, an denen Aminosäureübereinstimmungen mit entweder nur dem Herztyp oder nur dem Lebertyp gefunden worden. Zwei dieser Stellen liegen jeweils am Anfang und am Ende der C-terminalen cytosolischen Proteindomäne. In dem Sequenzabschnitt, der beim Rinderherzprotein die transmembrane Domäne bildet

sind die Fischpeptidsequenzen an drei Positionen zum Herztyp und an drei Positionen zum Lebertyp der Säugetiere homolog. In der relativ kurzen N-terminalen Matrixdomäne zeigen die Fischsequenzen an drei Positionen Übereinstimmungen mit dem Herztyp und an zwei Positionen Übereinstimmungen mit dem Lebertyp der Säugetiersequenzen. Die Fischpeptide der Untereinheit VIa haben also im wesentlichen im N-Terminus und in der transmembranen Domäne Sequenzeigenschaften, die jeweils einer der beiden Säugetierisoformen zugeordnet werden können. Die Struktur dieser Domänen scheint von besonderer Bedeutung für der Vermittlung regulatorischer Effekte durch die Untereinheit VIa zu sein. In Übereinstimmung damit zeigen einerseits die C-terminalen Peptiddomänen der Isoformen und der Fischproteine hohe Homologien und konnte andererseits die gewebespezifische ATP-Bindungsstelle im N-Terminus lokalisiert werden.

Durch die hohe Wärmekapazität des Wassers wäre eine wesentlich höhere Körpertemperatur als die des Wassers bei Fischen mit einem extrem großen Energieverbrauch verbunden. Eine effektivere Energieausnutzung wird durch Anpassung der Körpertemperatur an die Umgebung erreicht. Die warmblütigen Säugetierspezies entwickelten sich in einem anderen Milieu und erhalten für ihre Körperfunktionen eine relativ konstante, hohe Körpertemperatur aufrecht. Durch den Vergleich von Sequenzen der warmblütigen Säugetiere mit kaltblütigen Fischen kann - zusammen mit den Erkenntnissen über die Regulation gewebespezifischer Cytochrom-c-Oxidase Isoformen - darauf geschlossen werden, daß diese evolutionäre Anpassung der Säugetiere auf molekularer Ebene in der Struktur der Untereinheit VIa zu finden sind. Aufgrund der oben beschriebenen Sequenzanalyse kann diese molekulare Anpassung möglicherweise auf die Struktur der N-terminalen und der transmembranen Domäne dieses Peptids zurückgeführt werden. Auch wenn das Zusammenwirken der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten bei der Änderung der Enzymeffektivität sicher kompliziert ist, hat dieser Strukturbereich scheinbar eine zentrale Rolle für die zitterfreie Wärmeerzeugung der Säugetiere im Ruhezustand. Die Bedeutung der Untereinheit VIa für die Thermogenese wird auch durch Untersuchungen gestützt, wonach beim Rinderfötus (Ewart et al. 1991) und beim Menschen (Bonne et al. 1993) die Transkription der Herzform in Skelettmuskel und Herzmuskelzellen erst kurz vor der Geburt angeschaltet wird, das heißt kurz vor dem Wechsel in eine kältere Umgebung mit höheren Temperaturschwankungen.

Der phylogenetische Stammbaum aus einigen Nukleotidsequenzen für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa zeigt in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Saccone et al. 1990), größere Verwandtschaften zwischen den Lebertypen verschiedener Spezies und zwischen den Herztypen verschiedener Spezies als zwischen den beiden Isoformen eines Organismus. Die Verzweigung der Untereinheit VIa in Herz- und Leberisoformen ist nach diesem Stammbaum 340 My alt. Dies stimmt etwa im Rahmen der Fehlergrenzen mit den Rechnungen von Saccone überein. Das Alter für die Verzweigung der Leberformen von Ratte und Mensch wurde mit 75-85 My angegeben (Saccone et al. 1990). Dieser Wert ging in die Berechnung des Stammbaums als zeitliche Normierung ein. Aus der Methode ergeben sich ungenauere Zeitangaben für frühzeitliche Ereignisse als für jüngere Entwicklungsereignisse. Im Rahmen der Fehlergrenzen lassen sich folgende Aussagen machen: Die Verzweigung der Herzformen (von Ratte und Rind) ist mit 110 My älter als die Verzweigung der Leberformen (von Ratte und Mensch). Deutlich älter als die Verzweigung der Leberformen ist mit 120 My auch die getrennte Entwicklung der Untereinheit VIa Peptide von Karpfen und Forelle.

Weiterhin zeigt der Stammbaum eine gemeinsame Wurzel der Fischsequenzen mit den Herztypsequenzen der Säugetiere. Dieser Unterschied liegt aber noch innerhalb der Fehlergrenzen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß die Entwicklung der Herzformen, der Leberformen und der Fischpeptide der Untereinheit VIa drei unabhängige Entwicklungslinien anzeigen, welche spezielle Anpassungen darstellen: Die Leberformen sind Anpassungen an eine ständig warme Umgebung und bewirken eine effiziente Energieausnutzung in der Atmungskette. Die Herzformen bewirken einen Ausgleich von schnellen und großen Temperaturänderungen bei schwankendem Energieumsatz. Die Fischpeptide verhindern die Erzeugung von Wärme, die aufgrund der hohen Wärmekapazität des kalten Wassers für den Organismus verloren gehen würde.

Über cDNA-Isolierung wurde auch die maturierte Peptidsequenz für die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit Va der Forelle gewonnen. Diese Untereinheit zeigt sehr große Homologien zu den entsprechenden Untereinheiten der Säugetiere (Abschnitt 7.2.1.4). In der 109 Aminosäuren langen Sequenz treten an 18 Stellen Unterschiede zu Aminosäuren auf, die zwischen den Säugetieren Maus, Ratte, Rind

und Mensch konserviert sind. An 9 dieser 18 Stellen sind lediglich homologe Aminosäuren wie zum Beispiel Alanin und Valin oder Glutamat und Aspartat gegeneinander ausgetauscht (Abbildung 38). Die Untereinheit Va ist somit ein wesentlich konservierterer Teil der Cytochrom-c-Oxidase als die Untereinheit Vla.

9 Zusammenfassung

Mit degenerierten Primern von Peptidteilsequenzen der Karpfenherz Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa (Hüttemann et al. 1997) wurde das 3'-cDNA-Ende der Forellenuntereinheit VIa amplifiziert und charakterisiert, die bei der Enzymisolierung nicht gefunden wurde (Freund, Kadenbach 1994). Um die vollständige cDNA-Sequenz zu erhalten wurde mit komplementären Primern zu der 3'-terminalen mRNA-Sequenz das 5'-cDNA-Ende der Untereinheit VIa vervielfältigt und charakterisiert. Bei der Amplifikation des 5'-cDNA-Endes führte eine stabile RNA-Sekundärstruktur zur Isolierung unvollständiger 5'-cDNA-Enden. Ähnliche Probleme traten offenbar bisher auch bei cDNAs dieser Untereinheit aus anderen Spezies auf, von denen nur unvollständige Sequenzen charakterisiert wurden (Schlerf et al. 1990; Ewat et al. 1991). Durch Abwandlungen des 5'-RACE-Verfahrens konnte dieses Problem überwunden werden. Eine vermutete stabile mRNA-Sekundärstruktur wurde durch Strukturberechnungen bestätigt.

Wie bei der Untereinheit VIa wurde für die Untereinheit Va der Forelle mit degenerierten Primern der Karpfenpeptidteilsequenzen über cDNA-Sequenzen die sehr konservierte maturierte Peptidsequenz ermittelt.

Peptidsequenzvergleiche deuteten darauf hin, daß die Untereinheit VIa bei der Forelle im Gegensatz zu den Säugetieren nicht in Isoformen vorkommt. Der Nachweis von gleichen Mengenverhältnissen in fünf verschiedenen Geweben zwischen Transkripten der Untereinheit VIa und der Untereinheit Va, die nicht in Isoformen vorkommt bestätigte die Abwesenheit von Isoformen. Alle Organe zeigten weniger Transkripte der Untereinheit VIa als für die Untereinheit Va.

Die Säugetierherzisoform der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIa bewirkt eine ATP-abhängige Regulation der Enzymeffektivität (H^+/e^- -Stöchiometrie) im Muskel (Frank, Kadenbach, 1996). Cytochrom-c-Oxidase-Sequenzen von kaltblütigen Tieren wie Fischen waren bisher unbekannt. Die Abwesenheit von Isoformen der Untereinheit VIa im kaltblütigen Fisch bestätigt die postulierte Funktion dieser Untereinheit an der zitterfreien Thermogenese im Muskel.

Phylogenetische Rechnungen für die Untereinheit VIa zeigten die Entwicklung der Fischpeptide und der Säugetierisoformen aus einem gemeinsamen Vorläuferpeptid.

10 Literatur

- Anthony, G.; Reimann, A.; Kadenbach, B.; 1993, 'Tissue-specific regulation of bovine heart Cytochrome c Oxidase by ADP via interaction with subunit VIa' *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **90**, 1652-1656
- Arnaudo, E.; Hirano, M.; Seelan, R.S.; Milatovich, A.; Hsieh, C.L.; Fabrizi, G.M.; Grossman, L.O.; Francke, U.; Schon, E.A.; 1992, 'Tissue specific expression and chromosome assignment of genes specifying two isoforms of subunit VIIa of human Cytochrome c Oxidase', *Gene*, **119**, (2) 299-305
- Becker, A.; Reith, A.; Napiwotzki, J.; Kadenbach, B.; 'A quantitative Method of Determining Initial Amounts of DNA by Polymerase Chain Reaction Cycle Titration Using Digital Imaging and a Novel DNA Stain
- Bennett, A.J.; Else, P.L.; 1981, *Am.J.Physiol.* v.241, N5
- Bolgiano, B.; Smith, L.; Davies, H.C.; 1988, 'Kintetics of the interaction of the Cytochrome c Oxidase of *Paracoccus denitrificans* with ist own and bovine Cytochrome c', *Biochim.Biophys.Acta*, **933**, 341-350
- Bonne, G.; Seibel, P.; Possekkel, S.; Marsac, C.; Kadenbach, B.; 1993, 'Expression of human cytochrome c oxidase subunits during fetal development', *Eur.J.Biochem.*; **217**, 1099-1107
- Capaldi, R.A.; 1990, 'Structure and funktion of cytochrome c oxidase', *Ann.Rev.Biochem.*; **59**, 569-596
- Chepuri, V.; Lemieux, L.; An.D.C.; T.; Gennis, R.B.; 1990, 'The sequence of the cyo Operon indicates substantial structural simularities between the Cytochrome Ubiquinol Oxidase of *Escherichia coli* and the aa₃-typefamily of Cytochrome c Oxidases', *J.Biol.Chem.*; **265**, 11185-11192
- Dowhan. W.; Ribus, C.R.; Schatz, G.; 1985, 'The cytoplasmatically-made subunit IV is necessary for assembly of cytochrome c oxidase in yeast', *EMBO*, **4**, 179-184
- Droste, M.; Schon, E.; Kadenbach, B.; 1989, 'Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit Va from rat heart cytochrome c oxidase, *Nucleic Acids Res.*; **17**, 4375

- Enders, C.; Schlerf, A.; Mell, O.; Grossman, L.I.; Kadenbach, B.; 1990, 'Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIIa of rat liver Cytochrome c Oxidase', *Nucleic Acids Res.*; **18**, 7143
Eurotext Ltd.; 347-358
- Ewart, G.D.; Zhang, Y.-Z.; Capaldi, R.A.; 1991, 'Switching of bovine Cytochrome c Oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development', *FEBS*, **292**, (1.2.) 79-84
- Fabrizi, G.M.; Rizzuto, R.; Nakase, H.; Mita, S.; Kadenbach, B.; Schon, E.; 1989, 'Sequence of a cDNA specifying subunit VIa of human Cytochrome c Oxidase', *Nucleic Acids Res.*; **17**, (15), 6409
- Fabrizi, G.M.; Sadlock, J.; Hirano, M.; Mita, S.; Koga, Y.; Rizzuto, R.; Zeviani, M.; Schon, E.A.; 1992, 'Differential expression of genes specifying two isoforms of subunit VIa of human cytochrome c oxidase', *Gene*, **119**, 307-312
- Felsenstein, 1981, *J.Mol.Evol.* **1**, 368-376
- Frank, V.; Kadenbach, B.; 1996 'Regulation of the H^+/e^- -stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intraliposomal ATP/ADP ratios' *FEBS Lett.* **382**, 121-124
- Freund, R.; Kadenbach, B.; 1994, 'Identification of tissue specific isoforms for subunit Vb and VIIa of Cytochrome c Oxidase isolated from rainbow trout', *FEBS*, **221**, 1111-1116
- Frohmann, M.A.; 1995, 'PCR Primer. A Laboratorial Manual' (C.W. Dieffenbach and G.S. Dveksler, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 381-409
- Geier, B.M.; Schagger, H.; Ortwein, C.; Link, T.A.; Hagen, W.R.; Brandt, U.; Jagow, G.; 1995 'Kinetic properties and ligand binding of the eleven-subunit cytochrome-c oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large-scale purification method' *Eur.J.Biochem.*; **227**, 296-302
- Goglia, F.; Lanni, A.; Barth, J.; Kadenbach, B.; 1994, 'Interaction of diiodothyronines with isolated Cytochrome c Oxidase', *FEBS*, **346**, 295-298
- Goto, Y.; Amuro, N.; Shukuya, R.; 1982, 'Cytochrome c Oxidase from the liver of bulldog, *Rana catesbeiana* and change in its turnover rate during metamorphosis', *Biochem.Biophys.Acta*, **719**, 102-110
- Haltia, T, 1992, 'Reduction of Cu_A induces a conformational change in Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*', *Biochim, Biophys.Acta*, **1098**, 343-350

- Haltia, T.; Puustinen, A.; Finel, M.; 1988, 'The *Paracoccus denitrificans* Cytochrome aa₃ has a third subunit', FEBS.; **172**, 543-546
- Hay, R.; Böhni, P.; Gasser, S.; 1984, 'How mitochondria import proteins', Biochim.Biophys.Acta, **779**, 65-87
- Heldmaier, G.; Klaus, S.; Wiesinger, H.; Friedrichs, U.; Wenzel, M.; 1989, 'Living in the cold', Ed. A.Malam, B.Canguilhem, Colloque INSERM/John Libbey
- Hon-nami, K.; Oshima, T.; 1984, 'purification and characterization of Cytochrome c Oxidase from thermophilus HB8', Biochemistry, **23**, 454-460
- Hurt, E.C.; Pescold-Hurt, B.; Schatz, G.; 1984, 'The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix', FEBS Lett.; **178**, 6583-6591
- Hüttemann, M, Exner, S.; Arnold, S.; Lottspeich, F.; Kadenbach, B.; 1997, 'cDNA Sequences of Cytochrome-c Oxidase Subunit VIa suggest no Isoforms in Fish', BBA (in press)
- Iwata, S.; Ostmeier, C.; Ludwig, B.; Michel, H.; 1995, 'Structure at 2.8 Å resolution of Cytochrome c Oxidase from *Paracoccus denitrificans*', Nature, **376**, 660-669
- Kadenbach, B.; Barth, J.; Akgün, R.; Freund, R.; Linder, D.; Possekkel, S.; 1995, 'Regulation of mitochondrial energy generation in health and disease', Biochim. Biophys. Acta, **1271**, 103-109
- Kadenbach, B.; Freund, R.; Barth, J.; Akgün, R.; Linder, D.; Goglia, F.; 1995, 'Regulation of electron transport and proton pumping of Cytochrome c Oxidase by nucleotides and Thyroid hormones', Progress in Cell Res.; **5**, 19-23
- Kadenbach, B.; Jarausch, J.; Hartmann, R.; Merle, P.; 1983, 'Separation of mammalian Cytochrome c Oxidase into 13 Polypeptides by a Sodium Dodecyl Sulfate-gel electrophoresis procedure', Anal.Biochem.; **129**, 517-521
- Kadenbach, B.; Kuhn-Nentwig, L.; Büge, U.; 1987, 'Current Topics in Bioenergetics' (Lee ed.), **15**, 11 3.1.61, Academic Press New York
- Kai, M.; Yano, T.; Tamegai, H.; Fukumori, Y.; Yamamaka, T.; 1992, 'Thiobacillus ferrooxidans Cytochrome c Oxidase: purification and molecular and enzymatic features', J.Biochem.; **112**, 816-821

- Kang, S.; Ohshima, K.; Shimizu, S.; Amirhaeri, S.; Wells, D.; 1995, 'Pausing of DNA Synthesis *in Vitro* at Specific Loci in CTG and CGG Triplet Repeats from Human Hereditary Disease Genes', J.Biol.Chem., **270**, No 45, 27014-27021
- Kins, S.; Ohshima, K.; Shimizu, M.; Amithaeri, S.; Wells, D.; 1995, 'Pausing of DNA Synthesis *in Vitro* at Specific Loci in CTG and CGG Triplet Repeats from Human Hereditary Disease Genes'
- Klingenberg, M.; 1990, 'Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue', Trends Biochem.Sci.; **15**, 108-112
- Kuhn-Nentwig, L.; Kadenbach, B.; 1984, 'Immunological identification of four different polypeptides in subunit VII of mammalian Cytochrome c Oxidase', FEBS Lett.; **172**, 189-192
- Lightowlers, L.; Ewart, G.D. Aggeler, R.; Zhang, Y.-Z.; Calvetta, L.; Capaldi, R.A.; 1990, 'Isolation and characterization of the cDNA's encoding two isoforms of subunit C_{VIII} of bivariate Cytochrome c Oxidase', J.Biol.Chem.; **365**, 2677-2681
- Mell, O.; Seibel, P.; Kadenbach, B.; 1994, 'Structural organisation of the rat genes encoding liver- and heart-type of cytochrome c oxidase subunit VIa and a pseudogene related to the COXVIa-L cDNA', Gene, **140**, 179-186
- Merle, P.; Kadenbach, B.; 1980, 'On the heterogeneity of vertebrate Cytochrome c Oxidase polypeptide chain composition', Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.; **361**, 1257-1259
- Mitchell, P.; 1966, 'Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation', Biol.Rev.**41**, 445-502
- Nakagawa, T.; Maeschima, M.; Muto, H.; Kajiura, H.; Asashi, T.; 1987, 'Separation, amino-terminal sequence and cell-free synthesis of the smallest subunit of sweet potato cytochrome c oxidase', Eur.J.Biochem.; **165**, 303-307
- Napiwotzki, J.; Shinzawa-Itoh, K.; Yoshikawa, S.; Kadenbach, B.; 1997, 'ATP and ADP bind to cytochrome c oxidase and regulate its activity' submitted
- Nielsen, P.J.; Ayane, M. and Kohler, G.; 1989, 'Nucleotide sequence of cDNA encoding mouse cytochrome c oxidase subunit Va', Nucleic Acids Res. **17**, 6723
- Papa, S.; Capitanio, N.; DeNitto, E.; 1987, 'Characteristics of the redox-linked proton ejection in beef-heart Cytochrome c Oxidase reconstituted in liposomes', Eur.J.Biochem.; **164**, 507-516

- Rizzuto, R.; Nakase, H.; Darras, B.; Francke, U.; Fabrizi, G.M.; Mengel, T.; Walsh, F.; Kadenbach, B.; DiMauro, S.; Schon, E.A.; 1989, 'A gene specifying subunit VIII of human cytochrome c oxidase is localized to chromosome 11 and is expressed in both muscle and non-muscle tissues', **264**, 10595-10600
- Rizzuto, R.; Nakase, H.; Zeviani, M.; DiMauro, S. and Schon, E.A.; 1988, 'Subunit Va of human and bovine cytochrome c oxidase is highly conserved', *Gene*, **69**, 245-256
- Rohdich, F.; Kadenbach, B.; 1993, 'Tissue specific regulation of Cytochrome c Oxidase efficiency by nucleotides', *Biochemistry*, **32**, 8499-8503
- Saccone, C.; Pesole, G.; Kadenbach, B.; 1991, 'Evolutionary analysis of the nucleus-encoded subunits of mammalian cytochrome c oxidase', *Eur.J.Biochem.*; **195**, 151-156
- Saraste, M.; 1990, 'Structural features of Cytochrome c Oxidase', *Q.Rev.Biophys.*; **23**, (4) 331-366
- Saraste, M.; Metso, T.; Nakari, T.; Jalli, T.; Lavaraeus, M.; van der Oost, J.; 1991, 'The *Bacillus subtilis* cytochrome-c-oxidase. Variations on a conserved protein theme', *Eur.J.Biochem.*; **195**, 517-525
- Saraste, M.; Ratio, M.; Jalli, T.; Perämaa, A, 1986, 'A gene in *Paracoccus* for subunit III of Cytochrome Oxidase', *FEBS Lett.*; **206**, 154-156
- Schatz, G.; Butow, R.A.; 1979, *Cell*, **32**, 316-318
- Scheja, K.; Kadenbach, B.; 1992, 'Nucleotide sequence of cDNA encoding subunit VIII of Cytochrome c Oxidase from rat heart', *Biochim.Biophys.Acta*, **1132**, 91-92
- Schlerf, A.; Droste, M.; Winter, M.; Kadenbach, B.; 1988, 'Characterization of two different genes (cDNA) for cytochrome c oxidase subunit VIa from heart and liver of the rat', *EMBO J.*; **7** (8), 2387-2391
- Schlerf, Andrea, 1990 Dissertation, Philipps Universität Marburg, S.99-103
- Schneyder, B.; Mell, O.; Anthony, A.; Kadenbach, B.; 1991, 'Cross reactivity of monoclonal antibodies and cDNA hybridisation suggest evolutionary relationships between cytochrome c oxidase subunits VIa and Vic and between VIIa and VIIb', *Eur.J.Biochem*, **198**, 85-92
- Seelan, R.S.; Grossman, L.I.; 1991, 'Cytochrome c Oxidase subunit VIIa Isoforms', *J.Biol.Chem.*; **266**, 19752-19757

- Seelan, R.S.; Scheuner, D.; Lomax, M.I.; Grossman, L.I.; 1989, 'Nucleotide sequence of a cDNA for bovine Cytochrome c Oxidase subunit VIIa', *Nucleic Acids Res.*; **17**, 6410
- Siegel, E.; Carafoli, E.; 1980, 'Quantitative analysis of the proton and charge stoichiometry of Cytochrome c Oxidase from beef heart reconstituted into phospholipid vesicles', *Eur.J.Biochem.*; **111**, 299-306
- Smith, E.O.; Bement, B.M.; Grossman, L.Z.; Lomax, M.Z.; 1991, 'The cDNA for the heart/muscle isoform of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa encodes a presequence', *Biochim.Biophys.Acta*, **1089**, 266-268
- Steverding, D.; Köhnke, D.; Ludwig, D.; Kadenbach, B.; 1993, 'Proton slippage in Cytochrome c Oxidase of *Paracoccus denitrificans*', *FEBS.*; **212**, 827-831
- Suske, G.; Mengel, T.; Cordingley, M.; Kadenbach, B.; 1987, 'Molecular cloning and further characterization of cDNA's for rat nuclear encoded Cytochrome c Oxidase', *FEBS.*; **168**, 233-237
- Taanman, J.-W.; Capaldi, R.A.; 1993, 'Subunit VIa of yeast Cytochrome c Oxidase is not necessary for assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity', *J.Biol.Chem.*; **268**, (25) 18754- 18761
- Taanman, J.-W.; Turina, P.; Capaldi, R.A.; 1994, 'Regulation of Cytochrome c Oxidase by interaction of ATP at two binding sites, one on subunit VIa', *Biochem.*; **33**, 11833-11841
- Taanman, J.W.; Capaldi, R.A.; 1992, 'Purification of Yeast Cytochrome c Oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme', *J.Biol.Chem.*; **267**, 22481-22485
- Thomas, J.W.; Calhoun, N.W.; Lemieux, L.J.; Puustinen, A.; Wikström, M.; Alben, J.O.; Gennis, A.B.; 1994, 'Site directed mutagenesis of residues within helix VI in subunit I of the cytochrome bo₃ ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* suggests that tyrosine 288 may be a Cu^B ligand', *Biochemistry*, **33**, 13013-13021
- Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S.; 1995, 'Structures of metal sites of oxidized bovine heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å', *Science*, **269**, 1069-1074
- Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S.; 1996, 'The whole

- structures of oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å', *Science*, **272**, 1136-1144
- von Jagow, G.; Engel, E.D.; 1980, 'Struktur und Funktion des energieumwandelnden Systems der Mitochondrien', *Angew.Chem.*; **92**, 684-700
- Weishaupt, A.; Kadenbach, B.; 1992, 'Selective removal of subunit VIb increases the activity of cytochrome c Oxidase', *Biochemistry*, **31**, 11477-11481
- Wikström, M.; 1984, 'Pumping of protons from the mitochondrial matrix by Cytochrome c Oxidase', *Nature (London)*, **308**, 558-560
- Wikström, M.; Krab, K.; Saraste, M.; 1981, 'Cytochrome c Oxidase-A synthesis', Academic Press, New York, USA
- Wikström, M.; Saari, H.T.; 1977, 'The mechanism of energy conservation and translocation by mitochondrial Cytochrome c Oxidase', *Biochim.Biophys.Acta*, **462**, 347-361
- Wilson, M.T.; Lalla-Maharajk, W.; Darely-Usmar, V.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J.; Brunori, M.; 1980, 'Structural and functional properties of cytochrome oxidases isolated from sharks', *J.Biol.Chem.*; **225**, 2722-2728
- Winter, M.; 1991, Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Wright, R.M.; Ko, C.; Cumsy, M.G. and Poyton, R.O.; 'Isolation and sequence of the structural gene for cytochrome c oxidase subunit VI from *Saccharomyces cerevisiae*', *J. Biol. Chem.* **259** (24), 15401-15407
- Yamamaka, T.; Fujii, K.; 1980, 'Cytochrome a-type terminal oxidase derived from *Thiobacillus novellus*', *Biochim.Biophys.Acta*, **591**, 53-56
- Zucker, M.; 1989, *Science*, **244**, 48-52

Herrn Prof.Dr. Kadenbach danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Maik Hüttemann für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Annette Reith und Sandra Leist danke ich für die Einweisung in die PCR-Quantifizierungen und Michael Weber für Einweisung in die Computerrechnungen. Ebenfalls danke ich Thomas Blaschke für seine Hilfsbereitschaft.

Meiner Mutter danke ich für die Unterstützung während meines Studiums.